

D O K T O R I D I S S Z E R T Á C I Ó

Antivirális anyagtesztelés kidolgozása:

A $(2'-5')_3'dA(p3'dA)_2$ vírusellenes hatásának vizsgálata

Irta:

Karikó Katalin

Készült:

A Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézetében

1 9 8 2 .



Disszertációm az MTA SZBK Biofizikai Intézetének Nukleotid kémiai csoportjában készítettem. Köszönetet mondok dr. Tomasz Jenő tudományos főmunkatársnak, amiért lehetővé tette számomra, hogy pályakezdő éveim alatt csoportjában dolgozhattam, illetve, hogy e disszertációt elkészíthettem.

Hálásan köszönöm dr. Mécs Imre, dr. Duda Ernő és dr. Raskó István tudományos főmunkatársaknak mindazt a készséges segítségét és hasznos tanácsokat, amit a munkám során felmerülő problémák elméleti és gyakorlati megoldásában nyújtottak.



R Ö V I D I T É S E K

BHK [BHK 21/C 13]	/Baby hamster kidney/ ujszülött hörcsög veséjének per- manens sejtvonala
DMEM	/Dulbecco's Modified Eagle Medium/ tápfolyadék
PBS	/Phosphate Buffered Saline/, só- oldat
DMSO	dimetilszulfoxid, krioprotektív anyag
TCD ₅₀ /ml	/Tissue Culture Dose/ 50 %-os sejtkárosodást okozó virustiter
PFU/ml	/Plaque-forming unit/ az infektív /plaque-ot adó/ virustiter
m.o.i.	/multiplicity of infection/ az in- fektív vírus sejthez viszonyított szám aránya
kordicepin trimer	3'-deoxiadenilil-(2'-5')-3'-deoxi- adenilil-(2'-5')-3'-deoxiadenozin
$[(2'-5')3'dA(p3'dA)_2]$	5'-O-trifoszforil-adenilil-(2'-5')- -adenilil-(2'-5')-adenozin
$pppA(2'pA)_2$	

2.3. Az anyag antivirális tesztelése	27.
2.3.1. A kordicepin trimer	27.
2.3.2. Hipertóniás sokk	27.
2.3.3. Kordicepin trimerrel töltött liposzóma készítése	28.
2.3.4. Antivirális hatás előtesztelése mikrolemezen	29.
2.3.5. Az anyag virushozamot befolyásoló hatásának tesztelése mikrolemezen	30.
2.3.6. A tesztelt anyag sejtosztódásra gyakorolt hatásának meghatározása	31.
2.3.6.1. A sejtszám meghatározása	32.
2.4. A megbízhatósági intervallum meghatározása	33.
3. Eredmények	34.
3.1. A BHK sejtvonal azonosítása	34.
3.1.1. A BHK sejttenyészet osztódási sebességének meghatározása	34.
3.1.2. A BHK sejttenyészet kariológiai jellemzői	35.
3.2. A kordicepin trimer antivirális hatásának előtesztelése mikrolemezen	37.
3.2.1. A rövid, illetve hosszan tartó kordicepin trimer kezelés hatása a vírus okozta sejtdegradációra	37.
3.2.2. A különböző módon sejtbe juttatott kordicepin trimer antivirális hatásának összehasonlító vizsgálata	39.
3.2.3. A különböző időben /virusfertőzés előtt, alatt, illetve után/ alkalmazott kordicepin trimer kezelés antivirális hatásának vizsgálata	41.
3.2.4. A kordicepin trimer stabilitásának vizsgálata	42.
3.3. A sejtfagyasztás körülményeinek befolyása a kordicepin trimer antivirális hatására	44.
3.4. A kordicepin trimer viruskitermelést befolyásoló hatásának vizsgálata	45.

3.5. A kordicepin trimer hatása a sejtosztódásra	48.
4. Diskusszió	50.
5. Az eredmények összegzése	53.
6. Irodalom	54.

A vírusok okozta megbetegedések természetén és mesterén az orvostudományban a legutóbbi években a legnagyobb figyelmet keltő kutatások napjainkban a vírusok megelőzésének és gyógyításának kutatásaiban találhatók. A vírusok a természet egyik legkisebb, de legaktívabb egységei. A vírusok a legkisebb élő szervezetek, amelyek képesek a sejtek közötti mozgásra. A vírusok a legkisebb élő szervezetek, amelyek képesek a sejtek közötti mozgásra. A vírusok a legkisebb élő szervezetek, amelyek képesek a sejtek közötti mozgásra.

Az utóbbi három évtizedben azonban egyre nagyobb erőfeszítéseket tettek a víruskezelés kifejlesztésére. Ennek ellenére az eddig néhány, korlátozott használhatóságú antivirális anyagot sikerült felfedezni [11, 56]. A vírusellenes anyagok szükségességét és jelentőségét azonban nem lehet eléggé hangsúlyozni, ismerve azt a tényt, hogy napjainkban a legtöbb emberi megbetegedést és a legnagyobb gazdasági veszteséget a mikroorganizmusok közül a vírusok fertőzések okozzák [26].

A megfelelő víruskezelés kifejlesztésének nehézsége abból adódik, hogy a vírus szaporodásához közvetlenül a sejt interfériszt és funkcióit használja fel. Ezért a legtöbb anyag, mely a vírusok szaporodását gátolja, a sejtekre is toxikus.

Az ideális antivirális anyagnak specifikusnak kellene lennie a vírus "metabolizmusára" nézve, hogy a normális sejt funkcióit ne befolyásolja. Ennek eléréséhez azonban szükséges

1. BEVEZETÉS

1.1. Az antivirális anyagkutatás jelen állapota

A virusokozta megbetegedések természetes és mesterséges anyaggal történő megelőzésének és gyógyításának kutatása napjaink aktuális problémája; a közegészségügy, az állattenyésztés és a mezőgazdaság égető feladatainak egyike. Művelése sokáig háttérbe szorult az immunizálással elért korai sikerek, illetve a kezdeti viruskemoterápiai próbálkozások sikertelensége következtében.

Az utóbbi három évtizedben azonban egyre nagyobb erőfeszítéseket tettek a viruskemoterápia kifejlesztésére. Ennek ellenére is csak néhány, korlátolt használhatóságu antivirális anyagot sikerült felfedezni [13, 56/.

A virusellenes anyagok szükségességét és jelentőségét azonban nem lehet eléggé hangsúlyozni, ismerve azt a tényt, hogy napjainkban a legtöbb emberi megbetegedést és a legnagyobb gazdasági veszteséget a mikroorganizmusok közül a vírusos fertőzések okozzák [26/.

A megfelelő kemoterápiák kifejlesztésének nehézsége abból adódik, hogy a vírus szaporodásához közvetlenül a sejt intermediereit és funkcióit használja fel. Ezért a legtöbb anyag, mely a vírusok szaporodását gátolja, a sejtekre is toxikus.

Az ideális antivirális anyagnak specikusnak kellene lennie a vírusok "metabolizmusára" anélkül, hogy a normális sejt funkcióit befolyásolná. Ennek eléréséhez azonban szükséges

lenne a sejtműködés és a virusszaporodás pontosabb ismeretére, valamint a vizsgált antivirális anyag hatásmódjának és metabolizmusának a feltárására /7, 28/. Az antivirális anyag gyakorlati alkalmazhatóságának egyik előfeltétele a vírus diagnosztizálása. Ma már gyors és pontos azonosítási módszerek ismeretesek egyes vírusokra, de további feladat ezek kiterjesztése a ma még nehezen azonosíthatóakra /30, 44/.

Az antivirális drog kifejlesztése - a kutatás költségessége miatt - korlátozva van a nagy gyakorisággal előforduló vírusfertőzésekre /HSV, influenza/. A vírusos betegségek közül csak néhány életveszélyes, a legtöbb enyhe lefolyású, s a szervezet természetes védekező mechanizmusai visszaszorítják a vírus transzportját és szaporodását /29/.

A természetes vírusfertőzéssel szemben az első védelmi vonalat a szervezet interferon rendszere képviseli, majd az immunrendszer veszi át szerepét. Ezek a védekező mechanizmusok nem virusspecifikusak, ezért a szűk spektrumú, mesterséges antivirális kemoterápiák helyett a figyelem egyre inkább a szervezet természetes védelmében résztvevő anyagok felé fordul.

Napjainkban a vírusos betegségek megelőzésére és kezelésére már elterjedten használnak immunoglobulinokat, míg az interferon csak az elmúlt néhány évben került az antivirális anyagkutatás középpontjába és remélik, hogy alkalmazásával a vírusfertőzések megelőzésének és gyógyításának problémája végleg megoldható /7/.

1.2. Az interferon hatásmechanizmusa

Több mint 20 éve fedezte fel Isaacs és Lindenmann, hogy a humán interferon gátolja a vírusok szaporodását. Nemrégiben sejtosztódást csökkentő hatását állapították meg. Ez utóbbi felismerés lendületet adott az interferon szerkezet és hatásmechanizmus kutatásának, hisz tumor sejtosztódást gátló aktivitása nagy reményeket keltett az interferon antineoplasztikus anyagként való alkalmazhatósága iránt /43/. Ennek köszönhető, hogy az interferon az utóbbi években a rák- és virusellenes anyagkutatás középpontjába került.

Az interferon szerkezetének kutatása terén az elmúlt két évben a rekombináns DNS technika felhasználásával sikerült interferon géneket izolálni és klónozni, majd a humán leukocita és fibroblaszt interferon aminosav sorrendjét ill. génjük nukleinsav szekvenciáját meghatározni /52/. Kémiai uton szintetizálták az 514 bázispárból álló egyik humán leukocita interferon gént /18/. A legmodernebb génszézési eljárások felhasználásával sikerült a humán leukocita /48/, fibroblaszt és immun /27/ interferonok hatásos szintézisét is elérni *Escherichia coli*-ban.

A szerkezetkutatások során megállapították, hogy a humán interferon gén családkhoz legalább 14 leukocita interferon gén tartozik, melyek 80-95 %-os DNS homológiát mutatnak /25/. Ezideig egy fibroblaszt interferon gén ismeretes, mely 40-50 %-os homológiában van a leukocita inter-

feron génekkel. Az immun /limfocita/ interferon génből szintén egyet azonosítottak /27/.

Mindhárom interferon típus egy sor, közös biológiai hatással /virusszaporodást gátló, tumorellenes stb./ rendelkezik, de aminosav szekvenciájukban nagyon kevés a homológ szakasz /19/.

Az interferon hatásmechanizmus kutatása terén is jelentős eredményeket sikerült elérni. Virusosztódást gátló működése ma már részleteiben is jól megértett folyamat /43/, de emellett más aktivitásaira is sikerült fényt deríteni. A már említett virusszaporodás és sejtosztódás gátláson kívül, az interferon

- befolyásolja az immunrendszer működését
- fokozza bizonyos felületi antigének kifejeződését
- késlelteti a sejtdifferenciációt
- hatással van a sejt mikrofilamentum szerveződésére
- fokozza a fagocitózist

stb. /52/. Annak megállapítása, hogy ezek a változások összefüggésben állnak-e az antivirális állapot kialakulásával vagy fenntartásával, további kutatások feladatai.

Az interferon rendszer valószínűleg minden gerincesben működik, s a szervezet első számú védelmi vonala a különböző vírusfertőzések ellen. Az interferon 15 000 - 20 000-es mólsúlyu glikoprotein, melynek biológiai aktivitásához nem szükséges a karbohidrát egység jelenléte /42/. A fertőzött sejtekben szintetizálódik, majd szekretálódik.

Ezek a virusfertőzött sejtek általában elpusztulnak, de az általuk termelt interferon olyan folyamatokat indukál, melyek megakadályozzák a virusfertőzés szétterjedését a szervezetben. A cirkuláló interferon a szomszédos sejtek receptoraihoz kapcsolódik, s ez a kötődés - ma még ismeretlen módon - elindítja három sejtprotein szintézisét, melyek megakadályozzák a virus szaporodását /45/. Az ujonnan szintetizált fehérjék azonban mindaddig inaktívak, amíg a sejt nem fertőződik virussal. Ez az interferon által elindított aktivációs rendszer megvédi a sejt fehérje és nukleinsav szintetizáló mechanizmusát, ha a virusfertőzés nem áll fenn.

Az egyik ilyen inaktív fehérje egy protein kináz, mely duplaszálu RNS /a virusreplikáció egyik átmeneti terméke/ jelenlétében aktiválódik és ATP felhasználásával foszforilezi a peptid lánc iniciációs faktorának legkisebb alegységét, amely inaktív lesz. Így a peptid lánc iniciációja, s ezáltal a virusfehérje szintézise is gátlódik /11, 20/. Az interferon hatásának megszűnése után egy foszfatáz újra aktív formába hozza az iniciációs faktort, így a fehérjeszintézis rendszer regenerálódik, s elkerülhető a sejt pusztulása.

Az interferon által indukált másik fehérje szintén egy enzim. Ez az enzim a 2-5A polimeráz, virusfertőzéskor /dsRNS jelenlétében/ olyan folyamatot katalizál, mely során az ATP-ből $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}$ ($1 \leq n \leq 15$) szintetizálódik /35/. A keletkezett oligonukleotid nukleáz aktivátor, mely a harmadik fe-

hérjét, egy endonukleázt aktivál. Ez az enzim lebontja az egyesszálu RNS-t, így a vírus mRNS-t is, mielőtt lehetőség nyílna a vírusfehérje szintézisére /12, 5/.

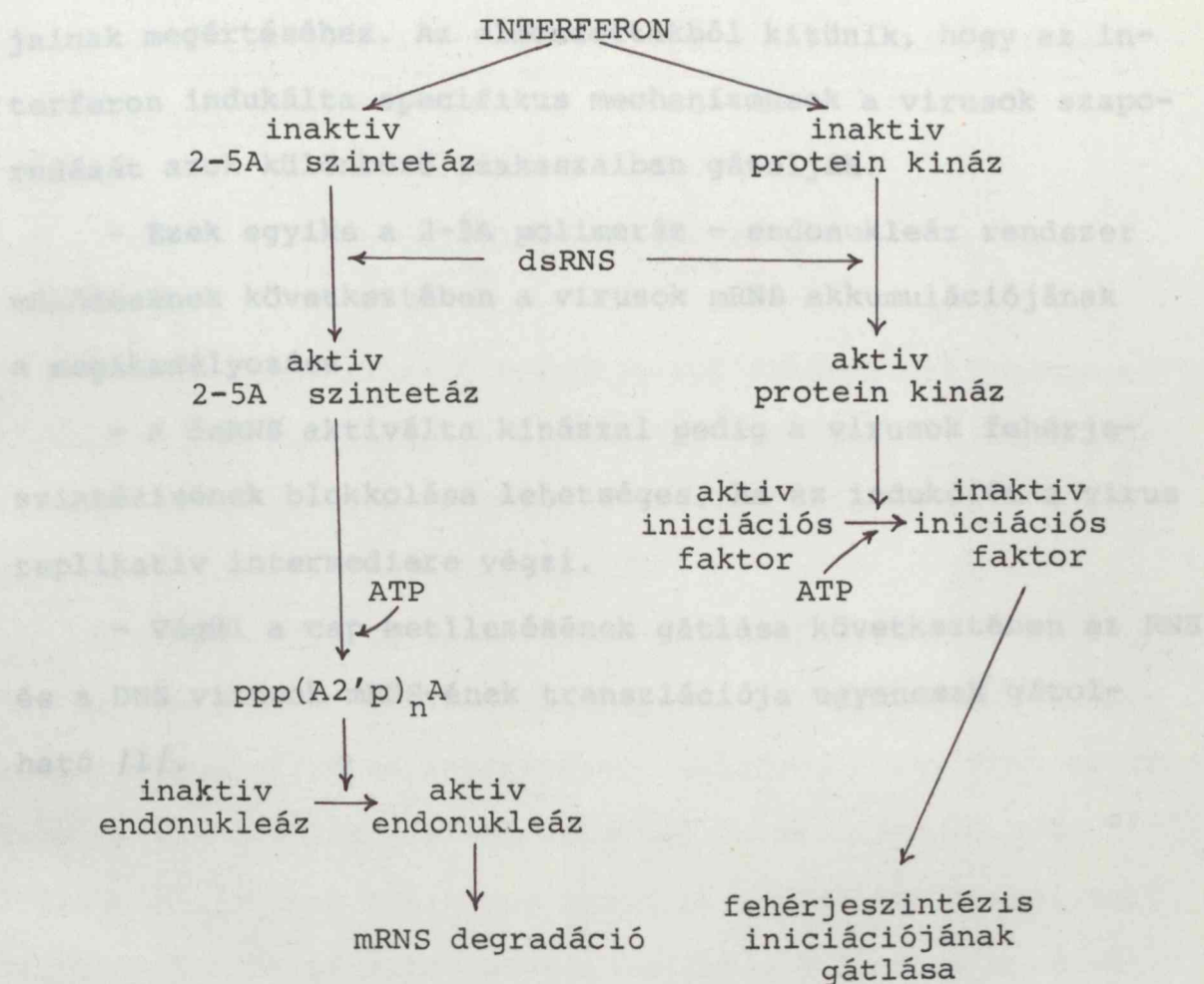
A dsRNS eliminációja után ez a rendszer is regenerálódik: a 2'foszfodiészteráz enzim az oligonukleotidot lebontja, ezáltal az endonukleáz újra inaktív állapotba kerül, s a sejt normál működése helyreáll.

Az interferon - a fent vázolt rendszerek mellett - szerepet játszik az mRNS-ek 5'végi úgynevezett "cap"-jének metilezésében is. Az interferon hatására a metilezett cap-et tartalmazó mRNS-ek száma 50%-kal csökken a sejtekben /14/. A nem metilezett végű mRNS affinitása a riboszómához csekély, ezért alig transzlálódik, s ennek következtében a vírus és a sejt fehérjeszintézise gátolt /22/.

Az elmondottakból kitűnik, hogy az interferon maga közvetlenül nem antivirális hatásu, csak az antivirális állapot létrehozója. Tehát bizonyos szempontból hormon sajátású, hisz néhány molekulája változások sorozatát hozza létre a sejt metabolizmusban /24, 52, 21/ (1. ábra).

Az interferon megjelenése a testszövetben további interferon molekulák szintézisét katalizálja. Így koncentrációja a vérben a vírusfertőzést követő néhány órán belül megnő, s a már ismertetett mechanizmus szerint megakadályozza a vírusok elszaporodását a szervezetben mindaddig, míg a lassabban reagáló immunrendszer át nem veszi szerepét /47/. Ez utóbbi stimulálásában az interferonnak szintén jelentős szerepe van.





1. ábra Az interferon hatásmechanizmusa /1/.

Az interferon-indukálta antivirális állapot létrehozásában résztvevő enzimszrendszerek nem virusspecifikusak, s ugyan-
 ugy érintik a sejt fehérjeszintézisét is /62/. E mechanizmu-
 sok működése az interferonnal nem kezelt retikulocitákban
 azt jelzi, hogy ezek az enzimek nemcsak az interferon rend-
 szer, hanem a normál sejt transzlációs kontrolljának is tag-
 jai /21/.

Az interferon indukálta enzimaktivitások felfedezése
 nagyban hozzájárult az antivirális állapot molekuláris alap-

jainak megértéséhez. Az elmondottakból kitűnik, hogy az interferon indukálta specifikus mechanizmusok a vírusok szaporodását azok különböző szakaszaiban gátolják.

- Ezek egyike a 2-5A polimeráz - endonukleáz rendszer működésének következtében a vírusok mRNS akkumulációjának a megakadályozása.

- A dsRNS aktiválta kinázzal pedig a vírusok fehérjeszintézisének blokkolása lehetséges, ha az indukciót a vírus replikatív intermediere végzi.

- Végül a cap metilezésének gátlása következtében az RNS és a DNS vírusok mRNS-ének transzlációja ugyancsak gátolható /1/.

1.3. A $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}$ szerepe a sejt antivirális állapotának kialakulásában

1.3.1. A $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}$ és a 2-5A polimeráz

Interferonnal kezelt sejtek citoplazma extraktumában ATP és duplaszálu RNS hatására olyan alacsony mólsúlyu inhibitor keletkezik, mely szubnanomoláris koncentrációban is hatásosan gátolja a fehérjék szintézisét /32/.

Elsőként Kerr és munkatársai izolálták ezt az inhibitort, majd meghatározták kémiai jellemzőit is. E kis mólsúlyu, hőstabil oligonukleotid szerkezetét nukleázos emésztések és kromatográfiás eljárások alkalmazásával határozták meg /36/. Igazolták, hogy az inhibitor adenzin molekulákból épül fel, melyek a biológiai rendszerekben eddig még ismeretlen 2'-5' foszfodiészter kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Megállapították, hogy ez az oligonukleotid nagyrészt trimerekből áll, de kisebb és nagyobb tagszámu inhibitorok is előfordulhatnak. Enzimes emésztéssel azt is bizonyították, hogy az oligonukleotidok 5' végéhez trifoszfát csoport kapcsolódik /35/.

Az oligonukleotid szerkezetének igazolását az inhibitor kémiai szintézisével végezték el. A természetes és szintetikus anyagot biológiailag ugyanolyan aktívnek találták, s a két anyag NMR spektruma is megegyezett.

Vizsgálataikból egyértelművé vált, hogy a fehérjeszintézis inhibitora a $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}$ (2-5A) szerkezetű oligonukleotid, melyet természetes úton az interferon-kezelt sejt

2-5A polimeráz enzime szintetizál ATP-ből, dsRNS jelenlétében /41, 49/.

Stark és mtsai állapították meg, hogy madarak és emlősök különböző sejtjeiben és szöveteiben működik a 2-5A polimeráz rendszer, de az enzimaktivitás nagysága széles skálán változik. Egyféle szövetben is nagy az enzimszint variációja az idő függvényében, ami arra utal, hogy a 2-5A polimeráz rendszer nemcsak az interferon-indukálta antivirális állapot kialakításában játszik szerepet, hanem a normális sejtállapot és differenciáció fenntartásában is /57/.

Ezek szerint a 2-5A polimeráz minden sejtben egy alacsony szinten jelen van, de az interferon kezelést követően az enzim aktivitása 2-3 órás lag fázis után lineárisan nő - néhány órán át -, majd 24 óra múlva az alapszintre csökken /4, 53/.

Baglioni és mtsai a sejtek kezelésére alkalmazott interferon koncentrációja, a 2-5A polimeráz enzim indukciója és a vírus RNS szintézisének inhibíciója közötti összefüggéseket figyeltek meg. A sejtek kezelésére alkalmazott interferon koncentrációjával arányosan nő a 2-5A polimeráz aktivitása és a vírus RNS szintézisének gátlása /3, 4/. Megállapítást nyert továbbá, hogy míg sejtmentes extraktumban csak a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ okozott fehérjeszintézis gátlást, intakt sejtekben az oligonukleotid trifoszfát nélküli származékával /core/ is el lehetett érni hasonló inhibíciót. Feltehető, hogy az oligonukleotid core intakt sejtekben foszforileződéssel aktiv $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ -vá képes átalakulni, míg sejtextraktumban ez a folyamat nem tud végbemenni /60/.

1.3.2. A $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ függő endonukleáz

Kísérletsorozatokkal sikerült bebizonyítani, hogy az interferon kezelés hatására létrejött fehérjeszintézis gátlásban, a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ reguláló szerepet játszik, mégpedig úgy, hogy egy endonukleázt aktivál, mely hasítja az mRNS-t.

Az RNS degradációjának mértéke arányos az oligonukleotid mennyiségével. Ez az endonukleáz azonban nem specifikus a vírus mRNS-re, egyaránt bontja a sejt és vírus eredetű, valamint a szabad és poliszómához kötött mRNS-eket. Ez az endonukleolitikus aktivitás két fázisra bontható:

- Az aktivációs szakaszban a 2-5A polimeráz dsRNS hatására ATP-ből $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ -t szintetizál.

- A második fázisban pedig az oligonukleotid által aktivált endonukleáz elhasítja az mRNS-t [12, 5, 62].

A korábban megfigyelt $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ okozta fehérjeszintézis gátlás az aktivált endonukleáz okozta mRNS degradációjának következménye volt.

Williams és Kerr igazolta, hogy az endonukleáz egyaránt jelen van az interferonnal kezelt, ill. nem kezelt sejtekben, de aktivitása az oligonukleotid jelenlététől függ [53, 60]. Intakt sejtekben végzett kísérletek során azt is megállapították, hogy az oligonukleotid indukálta nukleáz csak akkor tudja a vírus mRNS-eket jelentősen degradálni, s ezáltal a viruskitermelést gátolni, ha az egy sejtre jutó aktiv vírus száma, azaz a virusmultiplicitás kisebb egynél [59].

Valószínű, hogy ez az oka az interferon virusmultiplicitástól függő antivirális hatásának is /31, 63/.

Lengyel és mtsai meghatározták a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ által indukált nukleáz specificitását. Az enzim egy olyan endoribonukleáz, mely egyszáлу RNS-ekből a nukleotidok 3' foszfát származékát hasítja ki, különösen az UA, UG, UU szekvenciák után /23/.

Schmidt és mtsai megfigyelése szerint, ha a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ -t csak részlegesen tisztított endonukleázzal inkubálták az endonukleáz aktivitása elveszett az oligonukleotid degradációja következtében, melyet egy szennyezésként jelenlévő enzim okozott /51/.

Az endonukleáztól sikerült elkülöníteni egy enzimet, melyről kiderült, hogy a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ -t 5'ATP-re és 5'AMP-re bontja. Ezt az enzimet 2'foszfodiészteráznak nevezték el. Ez sejtes és sejtmentes rendszerekben a 2'-5' internukleotid kötést tartalmazó oligonukleotidot degradálja, s ennek következtében az endonukleáz inaktiválódik, s ezért a fehérjeszintézis gátlása csak átmeneti /61, 46/.

1.3.3. A 2'foszfodiészteráz

Az interferon-kezelt sejtekből olyan enzimet izoláltak, mely a 2'-5' internukleotid kötést nagyobb aktivitással hasította, mint a 3'-5' kötést. Ennek a 2'foszfodiészteráz enzimnek a szerepe az, hogy a $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}$ által aktivált endoribonukleáz hatását az oligonukleotid szintjének változtatásával szabályozza. A $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}$ -t lebontva megakadályozza a celluláris RNS-ek teljes degradációját, de ugyanakkor a nem acilezett tRNS-ek CCA terminusának hasításával - a tRNS-ek reverzibilis inaktiválásával - az mRNS transzlációját gátolja /50/.

A 2'foszfodiészteráz a dezoxi-adenozinból felépülő oligonukleotidot nem bontja, mert a hasításhoz az adenozin szabad 3'OH csoportjai is szükségesek.

Az enzim a $\text{pppA}2'\text{p}5'\text{A}2'\text{p}5'\text{A}$ oligonukleotid 3' végén foszfát csoporttal rendelkező származékát szintén nem tudja elhasítani, de az 5' végen elhelyezkedő foszfát csoportok nem befolyásolják működését, tehát feltehetően az enzim az oligonukleotid 3' végéről kezdi el a hasítást /50/.

A 2'foszfodiészteráz enzim felfedezésével az 5'trifoszfát csoport nélküli oligonukleotid, az ugynevezett core hatásmechanizmusára vonatkozó elképzelések kibővültek. A core nemcsak foszforileződés útján, hanem a 2'foszfodiészteráz kompetitív gátlásával is kifejtheti a hatását /37/. A kompetíció tényét bizonyítja, hogy az $\text{A}2'\text{p}5'\text{A}$ dinukleotiddal sikerült a 2'foszfodiészteráz okozta tRNS inaktivációt csökkenteni /50/.

Az interferon sejtosztódás gátló hatását a $\text{ppp}(\text{A}2'\text{p})_n\text{A}$ -n

keresztül fejt ki. Mitogén stimulusra a 2'foszfodiészteráz szintje megnő, s az oligonukleotid elbontása után a sejt ketté osztódik. Ennek a szabályozó mechanizmusnak a normális sejt osztódásában is szerepe van, ugyanis az oligonukleotid állandóan képződik, s a 2'foszfodiészteráz szintje határozza meg, hogy a sejt osztódik, vagy nyugalomban marad. Az osztódó sejtekben magas, a konfluens sejtekben alacsony 2'foszfodiészteráz enzimszint mérhető /37/.

A $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ szerepe a sejt antivirális állapotának kialakulásában a következőkben összegezhető: Virusfertőzés hatására interferon termelés indul meg, mely más sejtekre hatva 2-5A polimeráz szintézisét indítja meg. A vírus replikatív intermediere /dsRNS/ hatására az enzim $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ -t szintetizál, mely az endoribonukleáz enzimet aktiválja. Ez a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ függő nukleáz a vírus és sejt eredetű mRNS-eket degradálja, így a vírus szintézisét gátolja. A 2'foszfodiészteráz az oligonukleotid hasításával megakadályozza a sejteredetű mRNS-ek teljes lebontását, s így a sejt pusztulását /38, 34/.

A fent leírtakból jól kitűnik, hogy a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ központi szerepet játszik e bonyolult enzimrendszerek működésében, ezért nemzetközi szinten egyre több kutatócsoport foglalkozik annak vizsgálatával, hogy az oligonukleotid mely kémiai csoportjainak megléte szükséges az endonukleáz aktiválásához, s ezáltal az antivirális hatás kifejtéséhez, s mely csoportok teszik a $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ -t 2'foszfodiészteráz enzimmal szemben ellenállóbbá /54, 2, 15, 16/.

A $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ függő endonukleáz aktiválásához olyan oligonukleotid szükséges, melyben

- az internukleotid kötés 2'-5'
- a nukleotid tagszám legalább három
 - . ha trinukleotid, a 2' végen adenin legyen az utolsó bázis /17/
 - . ha 3 tagnál hosszabb, akkor az első három bázis legyen adenin /54/
- az 5' vég di- vagy trifoszfát legyen /58/.

A $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ hatásosságát fokozzák /szinergisták/ azáltal, hogy a 2'foszfodiészterázt kompetitive gátolják:

- $\text{pppA2}'\text{p5}'\text{A2}'\text{p5}'\text{A3}'\text{p}$ [bizonyos biológiai rendszerekben önmagában is hat/ /54/
- $\text{A2}'\text{p5}'\text{A}$ /50/
- $\text{A3}'\text{p5}'\text{A3}'\text{p5}'\text{A}$ /17/
- $[\text{A2}'\text{p5}'\text{A2}'\text{p5}']$, a core/ /50/.

A $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ hatását antagonizálják:

- 5' végü monofoszfát származékok /58/
 - heterotrimerek, s ezek 5'trifoszfát származékai /17/
- azáltal, hogy az endonukleázhoz kötődnek, csak nem tudják aktiválni, s így az enzim gátolt.

Lehetőség van tehát a központi szerepet játszó oligonukleotid olyan módosított származékainak készítésére, melyek stabilabbak és fokozott antivirális hatással rendelkeznek.

$\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ függő endonukleáz aktiválásához olyan oligonukleotid szükséges, melyben

1.4. Célkitűzéseink

Vizsgálataink során olyan anyagokat szintetizáltunk és vizsgáltunk, melyek analógok az interferon hatásmechanizmusában központi szerepet játszó $\text{ppp}(\text{A2}'\text{p})_n\text{A}$ oligonukleotiddal. Célunk az volt, hogy ezek az anyagok biológiai hatásukban - a látens endoribonukleáz aktiválásában - a természetes uton keletkező oligonukleotiddal megegyezzenek, de metabolikusan stabilabbak legyenek.

A biológiai vizsgálatokhoz laboratóriumot rendeztünk be és az antivirális tesztelésre alkalmas sejt-virus rendszert honosítottunk meg. A biológiai tesztek kialakításánál arra törekedtünk, hogy kevés anyagigényű, gyors módszereket dolgozzunk ki. Az ilyen előzetes vizsgálatoknál hatásosnak ítélt oligonukleotidok további részletes tanulmányozására pedig olyan tesztelést alkalmaztunk, mellyel az anyag antivirálisítása pontosan meghatározható.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A sejt

2.1.1. A BHK sejt eredete, jellemzői

A BHK 21/C 13 sejtvonal az MTA Szegedi Biológiai Központja Biokémiai Intézetének törzstenyészetéből származott. Az állandó tenyészetet egynapos sziriai hörcsög vese sejteinek transzformációjával állították elő. Az eredeti sejtvonal jellemzője:

1. fibroblaszt alaku
2. a sejtek 99 %-a felszínhez tapad
3. a sejtszám 48 óra alatt duplázódik
4. a sejtek 65 %-a 44 db kromoszómát tartalmaz,
25 %-a 36-45 darabot
5. a sejt jellegzetes kromoszómái: egy nagyméretű metacentrikus X és 5 pár telocentrikus.

2.1.2. A BHK sejt fenntartása és szaporítása

A sejtek fenntartására és szaporítására 5 % szérumtartalmu DMEM /SERVA/ tápfolyadékot használtunk. A szérum minden esetben 56 °C-on, 30 percig hőinaktivált mezőhegyesi borjusavó volt.

A sejteket 37 °C-on, 5 % széndioxidot és 95 % levegőt tartalmazó nedves termosztátban /NEW BRUNSWICK/ inkubáltuk.

- A sejtek tripszinezése, osztása:

A Petri-csésze konfluensen benőtt sejtjeit a tápfolyadék el-

távolítása után PBS-sel mostuk. Ezt követően a sejteket 3-5 percig tripszin /DIFCO/, PBS-ben elkészített 0,08 %-os oldattal emésztettük, majd a tripszinoldat eltávolítása után a sejteket tápfolyadékkal lemostuk a csésze felszínéről. A sejtszuszpenziót Petri-csészékbe osztottuk szét és termosztátban inkubáltuk.

A sejtek állapotát /kitapadás, sűrűség, alak stb./ invert mikroszkópos /TELEVAL/ vizsgálattal ellenőriztük.

2.1.3. A BHK sejtek fagyasztva tárolása és felolvasztása

A sejtosztást követő második napon a konfluens sejtenyészetet rövid tripszinezés után 10 % szérum tartalmu tápfolyadékkal mostuk.

A sűrű sejtszuszpenzió 1-1 ml-ét üvegampullákba mértük és jeges vízben hűtöttük. Ezt követően 1-1 ml 30 % glicerint /vagy 10 % DMSO-t/ tartalmazó DMEM-et mértünk mindegyik ampullába, s leforrasztottuk azokat.

Az ampullákba zárt sejteket 20 percig jeges-vizfürdőben, majd 30 percig -20°C -on tartottuk, végül -70°C -ra helyeztük. Az ampullák egy része 24 óra után -70°C -ról folyékony nitrogénes mintatárolóba -196°C / került.

A -70°C -on vagy -196°C -on tárolt sejtek gyors felolvasztását az ampulla 30°C -os vízfürdőben való állandó rázogatásával biztosítottuk.

A glicerines /vagy DMSO-s/ sejtszuszpenziót tápfolyadékkal felhígítottuk, majd a sejtek kitapadása után a tápfolya-

déket lecseréltük.

A felolvasztott sejteket csak többszöri /legalább 5/ tripszinezés után használtuk fel virustitráláshoz vagy anyagteszteléshez.

2.1.4. A sejt_osztódási_sebességének meghatározása

10 db 60 mm átmérőjű Petri-csésze mindegyikébe 4 ml $1,2 \times 10^5$ sejtet tartalmazó tápfolyadékot mértünk, majd a csészéket termosztátba helyeztük.

A sejtosztást követő különböző időpontokban meghatároztuk a Petri-csészékben lévő össz-sejtszámot úgy, hogy a tripszinezés után begyűjtött sejtszuszpenzió térfogatát lemértük és koncentrációját Bürker-kamrás sejtszámolással megállapítottuk.

2.1.5. A BHK sejt_kromoszóma_számaának meghatározása

1 db 80 mm átmérőjű sejtekkel benőtt Petri-csésze 5 ml tápfolyadékához mitotikus gátlás céljából 0,2 ml 10 γ /ml koncentrációju colcemidet mértünk.

5 órán át tartó inkubálás után a csészében lévő tápfolyadékkal a mitotikus állapotban lévő, lazán kitapadt sejteket begyűjtöttük. A sejtszuszpenziót 800-1000 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk. A felüluszt eltávolítottuk, majd a sejteket 3 ml 0,075 M-os vizes KCl oldatban felszuszpendáltuk. A sejtszuszpenziót 20 percig 37 °C-os vízfürdőben



tartottuk, majd 500 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk. A lecentrifugált sejteket a felüluszó 1 ml-ében felszuszpendáltuk, majd fixáltuk.

A sejtek fixálását úgy végeztük, hogy a szuszpenzióhoz állandó rázogató mellett 2 ml metanol:jégecet=3:1 elegyét adtuk cseppenként. Ezután 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltunk. A felüluszót eltávolítottuk és a fixálást /a citoplazma kimosást/ háromszor megismételtük, majd a citoplazma mentes sejteket 24 órán át -20°C -on tároltuk.

A fixált sejteket hideg, nedves tárgylemezre csöppentettük.

A kromoszómák festését 5 %-os Giemsa oldattal végeztük. /Az 5 % oldatot Giemsa törzsoldatból 0,5 M-os, pH 6.8 Sorensen pufferrel készítettük./

A tárgylemezre tapadt sejteket 10 percig a festékoldatban tartottuk, majd vízzel mostuk. A kromoszómákat mikroszkóp /Leitz fotomikroszkóp/ alatt számláltuk és fényképeztük.

2.2. A vírus

2.2.1. A Sindbis vírus eredete, jellemzői

A SZOTE Mikrobiológiai Tanszékétől kaptuk a Sindbis vírust, mely a Togavirusok osztályába, az alfavirusok csoportjába tartozó $+/RNS$ szálu, humán encefalitist okozó vírus. BHK sejtekben jól szaporodik, azok pusztulását okozza, ami jellegzetes, morfológiai változással jár együtt $/citolízis hatás/$. A Sindbis vírus szaporodási ciklusának ideje $37^{\circ}C$ -on 6-8 óra.

2.2.2. A magas titerű Sindbis törzsvírus létrehozása

$/Sindbis$ virusszuspenzió megtisztítása a defektív partikuláktól/

A Mikrobiológiai Tanszéktől kapott virusszuspenzióból tizes léptékben DMEM-mel hígítási sort készítettünk. Az előző nap 10^6 sejttel indított 10 db 60 mm átmérőjű Petri-csésze sejtjeire a tápfolyadék eltávolítása és PBS-ses mosás után a különböző virushígításokból 100-100 μl -t rétegeztünk. Egy órai, széndioxidos termosztátban történt inkubálás után a megfertőzött sejtekre 3 ml tápfolyadékot mértünk. További 18 órás inkubálás után a sejtek állapotát ellenőriztük: Magas víruskoncentrációval történt fertőzésnél a sejtek lekerekedtek és elpusztultak, míg a szuszpenzió nagy hígításainál az infektív vírus hiányában a sejtek épek maradtak. Abból a Petri-csészből, ahol a vírusfertőzés jelei még éppen láthatók, a nagyrészt infektív vírust tartalmazó tápfolyadékot begyűjtöttük és DMEM-mel tizes léptékű hígítási

sort készítettünk belőle, mellyel újabb sejteket fertőztünk.

Az itt leírt eljárást tizszer megismételtük, hogy megszabaduljunk a defektív partikuláktól és magas titerű törzsvirus szuszpenziót hozzunk létre.

2.2.3. A Sindbis törzsvirus tárolása

A nagy koncentrációban infektív virust tartalmazó szuszpenzió nagy részét 50-100 μ l-es aliquotokra osztva -70°C -on tároljuk. Néhány ampullát - mint biztonsági tartalékot - -196°C -on, folyékony nitrogénes mintatárolóban őrzünk.

2.2.4. Virustitrálás

2.2.4.1. A Sindbis virus titerének meghatározása mikrolemezen

A virusszuszpénzió közelítő pontosságú, gyors titrálásához 8×12 lyukat /gödröcskét/ tartalmazó mikrolemezt /FLOW/ használtunk, melyen egy gödröcske térfogata 350 μ l, köralapjának átmérője pedig 7 mm volt.

A lemez gödröcskéinek mindegyikébe 100 μ l 2×10^4 sejtet tartalmazó tápfolyadékot mértünk, majd a lemezt 37°C -ra, szén-dioxidos termosztátba helyeztük.

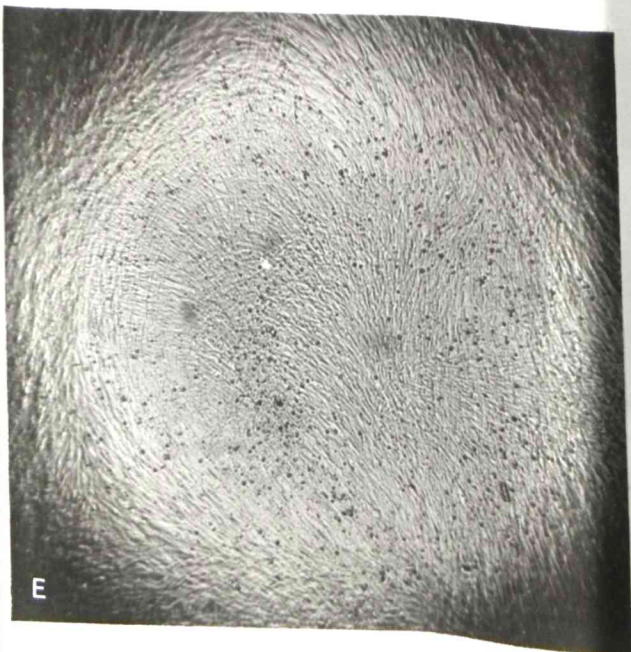
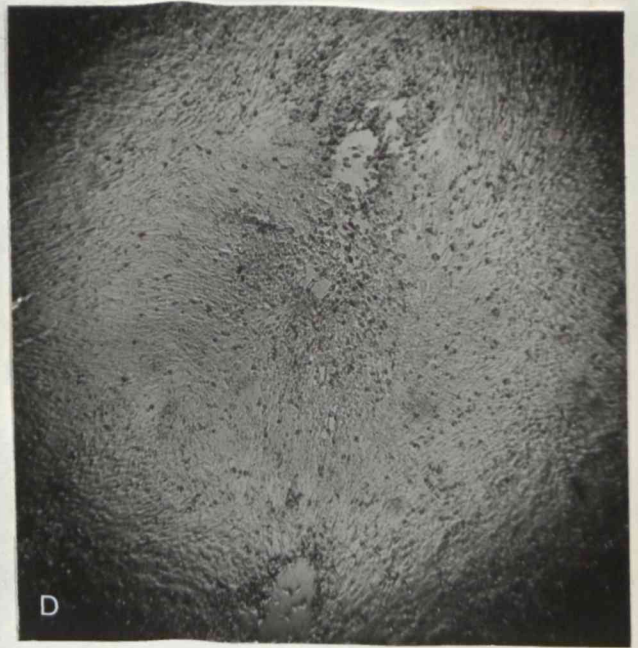
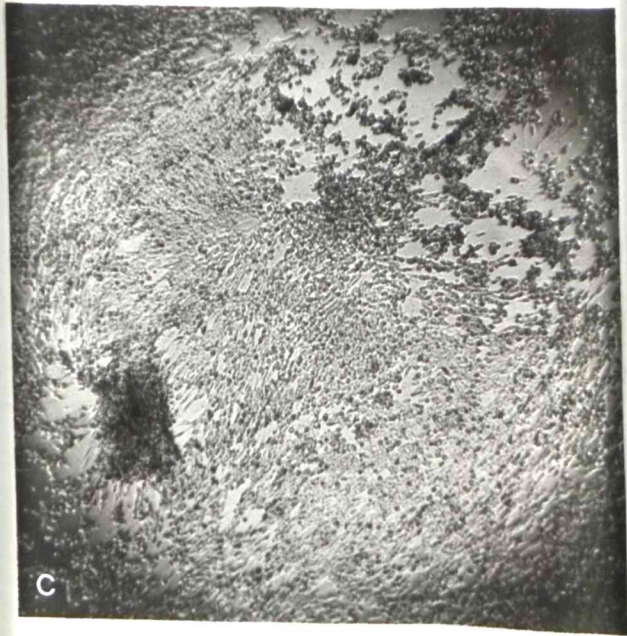
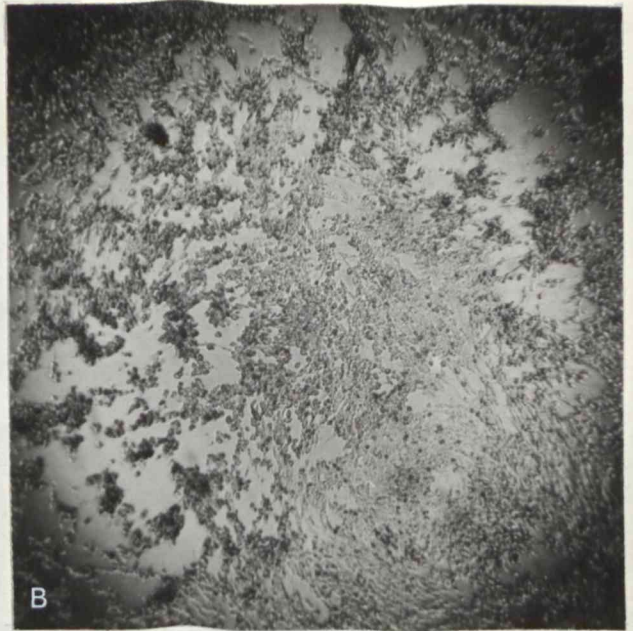
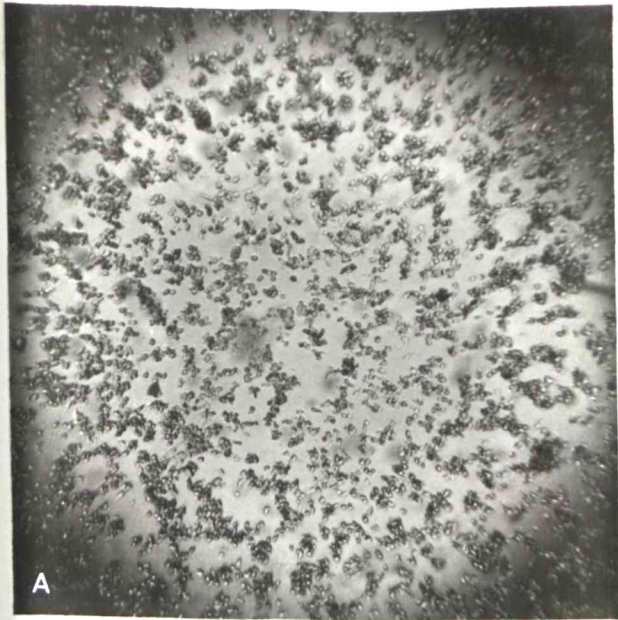
A sejtosztást követő napon elkészítettük a titrálandó virusszuszpénzió 8 tagból álló, tizes léptékű higitási sorát DMEM-ben.

A mikrolemez kitapadt sejtjeiről - melyek a gödröcske

alját 98-100 %-ban elfedik - a tápfolyadékot eltávolítottuk, s 100-100 μ l PBS-sel lemostuk azokat. A virusszuspenzió különböző higitásaiból 50-50 μ l-t mértünk a gödröcskék sejtjeire. Egy órán át tartó virusadszorpció után 50-50 μ l 10 % szérumot tartalmazó tápfolyadékot mértünk a sejtekhez, majd az inkubációt a termosztátban tovább folytattuk. A virusfertőzést követő 24. és 48. órában invert mikroszkópos vizsgálattal megállapítottuk a virus okozta sejtkárosodás mértékét. A kiértékelésnél a gödröcskék sejtlemezeinek öt különböző állapotát vettük figyelembe: a virusok a gödröcske sejtjeinek megközelítőleg 100 %-át (2A. ábra), 75 %-át (2B. ábra), 50 %-át (2C. ábra) vagy 25 %-át (2D. ábra) degradálták, ill. ha nem észlelhető sejtkárosodás (pl. kontroll 2E. ábra). Az adatok ismeretében - az irodalomból ismert matematikai levezetéssel meghatároztuk az 50 %-os sejtkárosodást okozó virustitert, azaz az 1 ml-re vonatkoztatott TCD_{50} /tissue culture dose/ értéket /40/. A mikrolemezen megállapított virus-titer érték alkalmas különböző virusszuspenziók azonos módon meghatározott titerértékeinek összehasonlítására, ill. ennek ismeretében a költség és anyagigényesebb, de pontosabb virustiter /PFU/ meghatározást elegendő egy szűkebb intervallumban elvégezni.

2.2.4.2. A Sindbis virus titerének meghatározása plaque-redukciós módszerrel

10 db 60 mm átmérőjű Petri-csésze mindegyikébe 4 ml 10^6 sejtet tartalmazó tápfolyadékot mértünk, s a sejteket termosztátban inkubáltuk 24 órán át.



2. ábra A Sindbis virus okozta BHK sejt degradáció mértékének kiértékelése mikrolemezen.

A vírusok a gödröcske sejtjeinek megközelítőleg 100 %-át (A), 75 %-át (B), 50 %-át (C), 25 %-át (D) károsították. Konfluensen nőtt sejtek a kontroll esetében (E).

Elkészítettük a titrálandó virusszuszpénzió tizes lép-
tékű higitási sorát DMEM-mel, majd a Petri-csészék konfluen-
sen benőtt sejtjeiről a tápfolyadékot eltávolítottuk. A 3-3
ml PBS-sel lemosott sejtekre 100-100 μ l-t mértünk a virus-
szuszpenzió különböző higitásaiból. Egy órás, 37 °C-on, ter-
mosztátban történt inkubálás után a sejtekre 4-4 ml 40-45 °C-
os festőagart rétegeztünk.

A festőagar összetevői a következők:

50 ml 2,2 %-os, forró deszt. vízben oldott noble agar /DIFCO/,

42 ml kétszeres töménységű DMEM /0,37 % NaHCO_3 tartalommal/,

4 ml hőinaktivált szérum,

4 ml 5 %-os, Hanks pufferben oldott laktalbumin hidrolizá-
tum /DIFCO/;

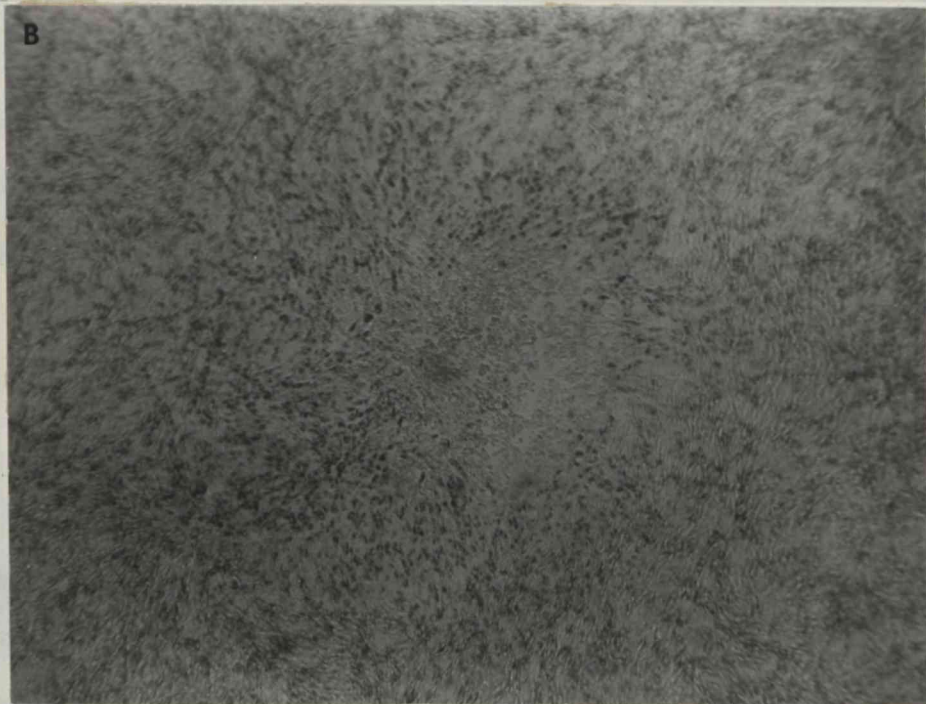
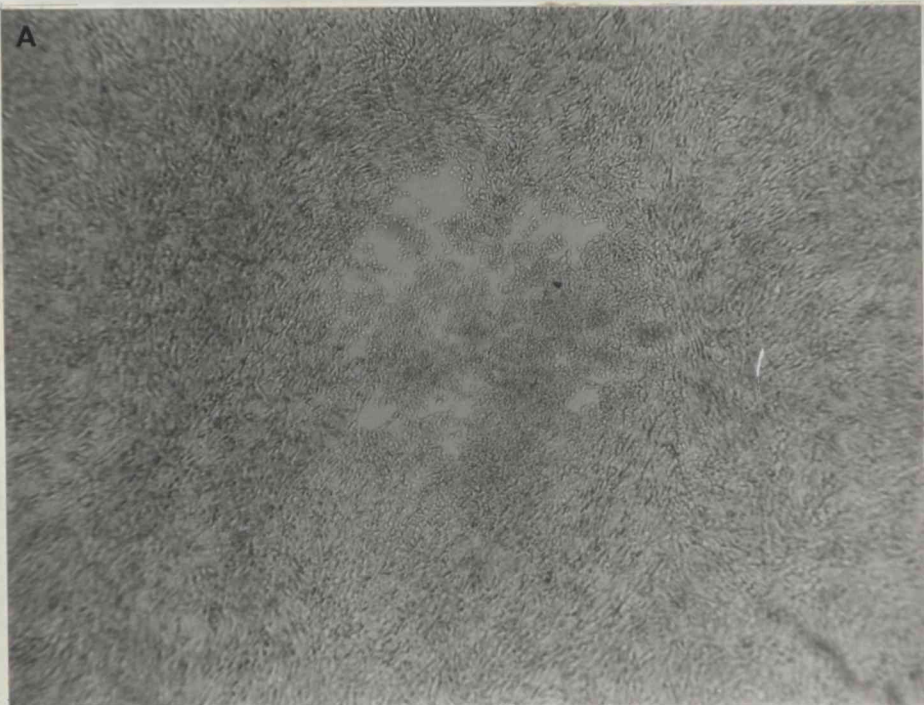
A festőagar pH-ját 1 M-os vizes HEPES /GIBCO/ nátriumsó oldat
/pH 8.7/ 2 ml-ével állítottuk be pH 7,0-ra.

Az agar megdermedése után a sejteket 2 napon át, 37 °C-on,
széndioxidos termosztátban inkubáltuk.

A 2 nap elteltével az agarral fedett sejteket invert mik-
roszkópon vizsgálva megállapítottuk a virus okozta sejtdegra-
dációt. A fertőzött sejtek elpusztultak és nem tapadtak a Pet-
ri-csésze aljához (3A ábra).

A plaque-szám pontos meghatározása céljából a sejteket
megfestettük, azaz minden Petri-csészéhez 4-4 ml festőagart
mértünk. A festőagar úgy készült, hogy 50 ml PBS-hez és 50 ml
forró PBS-ben elkészített 2,2 %-os agar oldathoz 2-3 ml 0,4 %-
os neutrál vörös /SERVA/ oldatot adtunk.

A festőagar megdermedése után az inkubációt tovább folytat-



3. ábra Sindbis vírus okozta plaque BHK sejteken neutrál
vörössel történt festés előtt (A) és után (B)

tuk a széndioxidos termosztátban. A festést követő 16-24 órában a plaque-okat összeszámláltuk.

Az elpusztult sejtek nem akkumulálják a festőagárban lévő neutrál vörös festéket, ezért a plaque fehér foltcskaként tűnik elő az egészséges, vörösre festődő sejtek környezetében (3B. ábra).

2.3. Az anyag antivirális tesztelése

2.3.1. A kordicepin trimer

A vizsgálatainkban felhasznált kordicepin trimert $[(2'-5')3'dA(p3'dA)_2]$ triészter módszerrel szintetizáltuk, a Pfleiderer szerinti /10b./ eljárás módosításával. Az anyag szerkezetének igazolását a kigyóméreg foszfodiészterázzal végrehajtott hidrolízis termékeinek rétegekromatográfiás azonosításával végeztük.

Teszteléseink során a kordicepin trimert nátriumsó formájában használtuk.

2.3.2. Hipertoniás sokk

A BHK sejtek membránjának permeabilizálását hipertoniás sokkolással végeztük. Az előző nap osztott, kitapadt sejteket a tápfolyadék eltávolítását és a PBS-ses mosást követően 20 percig kétszeres koncentrációju Hanks sóoldattal kezeltük /10/. A mikrolemez gödröcskéinek 2×10^4 sejtjére 100 μ l-t,

a Petri-csészék 5×10^5 sejtjére 2500 μl -t mértünk a Hanks oldatból.

A permeabilitás mértékét tripánkékes festéssel ellenőriztük, ugyanis a hipertóniás tápfolyadék eltávolítása után a permeabilissá tett sejtek festődnek, míg a nem permeabilisek nem veszik fel a tripánkék festéket /10/.

2.3.3. Kordicepin trimerrel töltött liposzóma készítése

40 mg marha agyból preparált foszfatidilszerin kloroformos oldatát bepároltuk.

A maradékot 7 ml NHTE pufferben /100 mM NaCl, 2 mM hisztidin, 2 mM TES, 0,4 mM EDTA/ felszuszpendáltuk, majd hűtés és N_2 átbuborékoltatása közben 10 percig ultrahangoztuk. Az ultrahangozó fejről levált titánt centrifugálással /10 perc, 3000 fordulat/perc/ eltávolítottuk.

Az ultrahangozott, lipid szuszpenzió 175 μl -éhez /1 mg foszfatidilszerin/ 5 μl 100 mM-os CaCl_2 oldatot adtunk.

A szuszpenziót egy órán át 37°C -os vízfürdőben tartottuk, majd a kialakult lipid-fragmentumokat lecentrifugáltuk /10 perc, 3000 fordulat/perc/.

A csapadékot vortexeztük, s hozzámértünk 100 μl 10^{-3} M-os kordicepin trimer oldatot /DMEM-ben oldva/. A lipid fragmentek és az oligonukleotid együttes vortexezése után a fragmenteket 35 μl 0,15 M-os EDTA oldat hozzáadásával vezikulákká zártuk.

A liposzómákat lecentrifugáltuk /20 perc, 14000 fordulat/perc/ és a sejtekre toxikus EDTA-t, valamint a vezikulán

kivüli kordicepin trimert tartalmazó felülszót eltávolítottuk. A liposzómás csomagolás hatásossága kb. 10 %, így az 1 ml DMEM-ben felszuszpendált liposzóma szuszpenzió kordicepin trimer koncentrációja kb. 10^{-5} M-os volt.

A fent leirt módszerrel párhuzamosan elkészítettük a kontrollként alkalmazandó "üres" liposzómákat is, melyeket kordicepin trimer helyett DMEM-mel készítettünk /39/.

2.3.4. Antivirális hatás előtesztelése mikrolemezen

A mikrolemez gödröcskéinek mindegyikébe 2×10^4 BHK sejtet osztottunk. 24 óra elteltével a letapadt sejtekről a tápfolyadékot eltávolítottuk és a sejtenyészeteket 100-100 μ l PBS-sel lemostuk.

Az 5×10^7 PFU/ml koncentrációju Sindbis virusszuszenzió tizes léptékű higitási sorozatának 10^0 -tól 10^{-8} -ig/ 50-50 μ l-ével a sejteket megfertőztük.

37 °C-on széndioxidos termosztátban történt 1 órás inkubáció után a virusszuszenziót eltávolítottuk.

Kísérleteink egy részénél itt egy permeabilizálási lépést /2.3.2/ iktattunk be, annak eldöntésére, hogy a vizsgált anyag sejtbejuttatásához szükség van-e a membrán permeabilizálására.

A következő lépésben a vizsgált anyag különböző 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M-os/ higitásaiból 50-50 μ l-t mértünk a mikrolemez gödröcskéinek különböző multiplicitással /m.o.i./ fertőzött sejteire.

A higitásokat DMEM-mel készítettük, s ezt rétegeztük a kontroll sejtekre is.

- Az inkubációt egy órán át folytattuk, majd az anyagot eltávolítottuk és 100-100 μ l tápfolyadékot mértünk a sejtekre.

- Abban az esetben, amikor a hosszantartó anyagkezelés antivirális hatását vizsgáltuk a tesztelt anyagot nem távolítottuk el az egy órás inkubáció után, hanem 50-50 μ l 10 % szérumszuszpenzió DMEM-mel kiegészítettük /az anyag koncentrációja így felére csökkent, de a kiértékelésig jelen volt a sejteken/. A makrolemez sejtjeit mindkét esetben 48 órán át inkubáltuk, s a fertőzést követő 24. és /vagy/ 48. órában a lemezeket a 2.2.4.1. fejezetben leírtak alapján kiértékeltek, majd meghatároztuk a TCD₅₀/ml értékeket. A kontroll gödröcskével történt összehasonlítás alapján megállapítottuk, hogy a tesztelt anyag különböző koncentrációju oldata hány százalékkal csökkenti a vírus okozta sejtdegradációt.

2.3.5. Az anyag virushozamot befolyásoló hatásának tesztelése makrolemezen

A virushozam meghatározásához 4x6 lyukat /gödröcskét/ tartalmazó makrolemezt /COSTAR/ használtunk, melyen egy gödröcske térfogata 4 ml, köralapjának átmérője 16 mm.

A makrolemezek gödröcskéibe 7×10^4 sejt/ml koncentrációju sejtuszuszpenzióból 2-2 ml-t mértünk.

24 órás inkubáció után a makrolemez 3 gödröcskéjében meghatároztuk a sejtszámot, mely $2,0 \pm 0,2 \times 10^5$ -nek adódott.



Miután a Sindbis vírus 2×10^5 PFU/ml koncentrációju szuszpenzióját DMEM-ben elkészítettük, a makrolemez sejtjeiről a tápfolyadékot eltávolítottuk.

A PBS-sel mosott sejtekre az elkészített virusszuszpénzió 100-100 μ l-ét mértük, s az ilyen módon 0,1-es multiplicitással fertőzött sejteket 1 órán át inkubáltuk 37°C -on, széndioxidos termosztátban. A virusszuszpénzió eltávolítása után a sejteket 2-2 ml PBS-sel lemostuk, majd a tesztelt oligonukleotid különböző koncentrációju, DMEM-ben elkészített oldatainak /ill. a DMEM-nek/ 100-100 μ l-ét a fertőzött sejtekre mértük. Egy órás inkubálás után az oldatokat eltávolítottuk a sejtekről, majd 1000-1000 μ l tápfolyadékot rétegeztünk a sejtekre.

Az inkubálást a fertőzést követő 0., 3., 6., 9., 12., 15. és 18. órában történt mintavételek idejéig 37°C -on tovább folytattuk.

Minden időpontban, a különböző anyagkoncentrációval kezelt sejtekről 2-2 párhuzamost tartalmazó virusszuszpénziót centrifugacsövekbe gyűjtöttünk. A sejttörmelékot lecentrifugáltuk /5 perc, 3000 fordulat/perc, 0°C -on/, s a virusszuszpénziók felüluszójából aliquotokat mértünk Eppendorf csövekbe.

A virustiter meghatározásáig ezeket a virusmintákat -70°C -on tároltuk.

2.3.6. A tesztelt anyag sejtosztódásra gyakorolt hatásának meghatározása

Makrolemezek gödröcskéinek mindegyikébe

$1,4 \times 10^5$

sejtet mértünk. A sejtosztást követő napon a gödröcskék sejtjeiről a tápfolyadékot eltávolítottuk, majd 2-2 ml PBS-sel történt mosás után a tesztelt anyag DMEM-ben elkészített különböző koncentrációju oldataiból, valamint DMEM-ből /kontroll/ 100-100 μ l-t mértünk a sejtekre.

a./ Egy órás inkubálás után a gödröcskék egy részéből a tesztelt anyag különböző koncentrációju oldatait eltávolítottuk és a sejtekre 1000-1000 μ l tápfolyadékot mértünk.

b./ Az egy órás inkubálást követően a "maradék" gödröcskék különböző anyagkoncentrációval kezelt sejtjeiről nem távolítottuk el az oligonukleotid oldatokat, hanem 900-900 μ l 6 % szérumot tartalmazó DMEM-et mértünk hozzá. A sejteket termosztátban inkubáltuk 37 °C-on a sejtszám meghatározásáig.

2.3.6.1. A sejtszám meghatározása

Az anyagkezelést megelőzően ill. az azt követő 3., 12., 28., 76. órában az anyag különböző koncentrációju oldataival 1 órán át és folyamatosan kezelt sejtekről a tápfolyadékot begyűjtöttük, majd a sejteket 110-110 μ l tripszin oldattal szuszpenzióba vittük. Majd a makrolemez gödröcskéiben levő sejteket 100-100 μ l PBS-sel, illetve 100-100 μ l, 10 % szérumot tartalmazó DMEM-mel lemostuk.

Az így összegyűjtött sejtszuszpensiókban lévő összsejtszámot a végtérfogat lemérése és Bürker-kamrás sejtszámlálás után határoztuk meg.

2.4. A megbízhatósági intervallum meghatározása

Egy kísérleten belül megfigyeléseink száma harmincnál kevesebb volt, így a megbízhatósági intervallumot a Student-féle t-eloszlás segítségével határoztuk meg:

$$\bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{n}}$$

Ebben az esetben a számolt paraméter 100 /1- α / %-os megbízhatósági intervallumát kaptuk. A képletben \bar{x} az adatok átlagát, n a megfigyelések számát, az s pedig a szórást jelenti. Az $n-1$ szabadságfokhoz tartozó t_{α} kritikus értéket a t-eloszlás táblázatából olvastuk ki.

Az empirikus szórást $/s/$ a következő összefüggés alapján számoltuk:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

ahol x a kísérleti adatok értékét jelenti /32/.

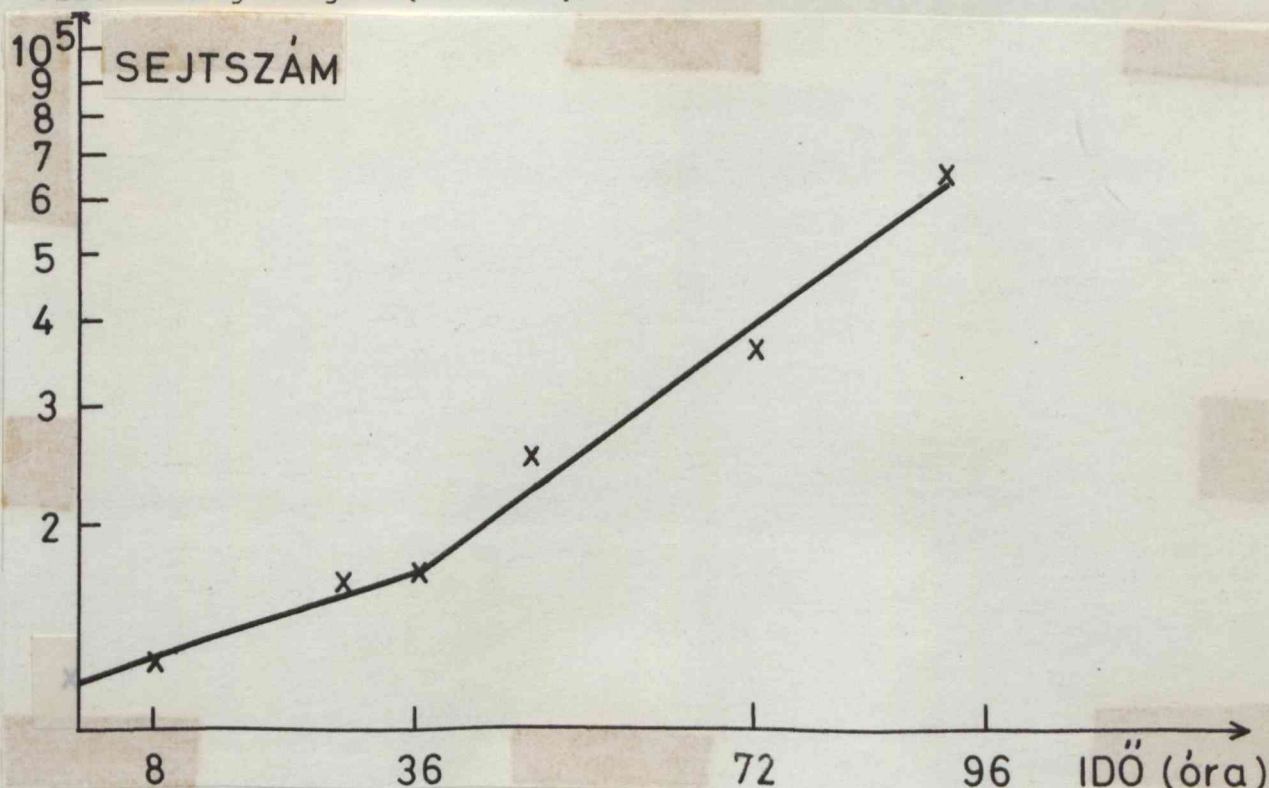
3. EREDMÉNYEK

3.1. A BHK sejtvonala azonosítása

A vizsgálatainkban használt BHK sejttenyészet évek óta fenn-tartott sejtvonalból származott. Ezért kísérleteink reprodukálhatósága érdekében szükségesnek tartottuk ellenőrizni, hogy sejttenyészetünk rendelkezik-e az eredetileg leírt BHK 21/C 13 sejtvonala sajátjaival. BHK sejttenyészetünk osztódási sebességét és kariológiai jellemzőit vizsgáltuk meg e célból.

3.1.1. A BHK sejttenyészet osztódási sebességének meghatározása

A 2.1.4. pontban leírtaknak megfelelően meghatároztuk BHK sejtvonalaunk osztódási sebességét, megrajzoltuk a sejt osztódási görbét (4. ábra).



4. ábra A BHK sejt osztódási görbéje

A 4. ábra adataiból látható, hogy az $1,2 \pm 0,1 \times 10^5$ sejtet tartalmazó Petri-csészékben a sejtek száma 48 óra alatt duplázódott meg, ami megegyezik a BHK sejt irodalmi adataival.

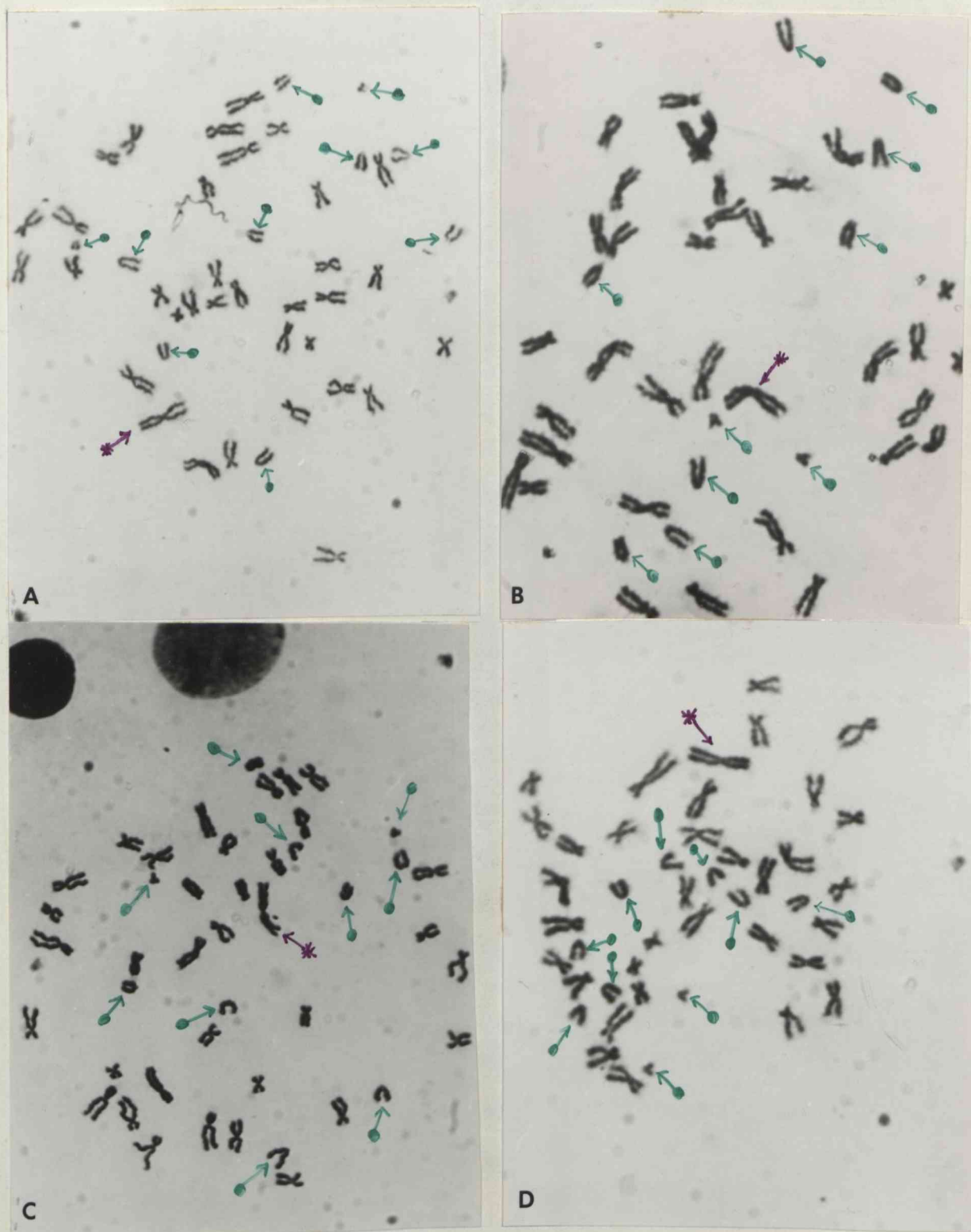
3.1.2. A BHK sejttenyészet kariológiai jellemzői

A 2.1.5. pontban írtuk le, hogyan festettük meg BHK sejttenyészetünk kromoszómáit.

A metafázisos kromoszómákat diploid sejtekben vizsgáltuk. 16 sejtmagban 44 db-ot, egyen 45-öt, háromban pedig 43 db kromoszómát számláltunk meg (5. ábra), s ez megfelel az irodalmi adatoknak.

A BHK sejtvonál eredeti leírásában szereplő, jellegzetes karakterisztikájú /egy nagy metacentrikus X és 5 pár telocentrikus/ kromoszómák is jelen voltak sejttenyészetünk mindenegyes megvizsgált sejtjében (5. ábra).

Sejttenyészetünk osztódási sebességének, a sejt morfológiájának, a kromoszómák számának és karakterisztikáinak ismeretében megállapítottuk, hogy a teszteléseink során használandó sejtvonál valóban BHK 21/C 13.



5. ábra BHK sejtek metafázisos kromoszómáinak száma 44 /A,B,D/ illetve 45 /C/ darab. A sejtvonagra jellemző: egy nagy, meta-centrikus X (←*) és az 5 pár telocentrikus (←●) kromoszómák.

3.2. A kordicepin trimer antivirális hatásának előtesztelése mikrolemezen

Mikrolemezen történt előtesztelések során megvizsgáltuk, hogy a sejten különböző ideig tartott, illetve eltérő időben és módon sejtbe juttatott kordicepin trimer hogyan befolyásolja a vírus okozta sejtdegradáció mértékét.

3.2.1. A rövid, illetve hosszantartó kordicepin trimer kezelés hatása a vírus okozta sejtdegradációra

A kordicepin trimer különböző koncentrációju oldatainak antivirális hatását a 2.3.4. pontban leírtaknak megfelelően teszteltük. Az anyagnak a sejtek permeabilizálását követő /2.3.2./ - 60 perces, ill. 24 órás inkubáció alkalmazásával - a vírus okozta sejt degradációra gyakorolt hatását vizsgáltuk meg (I. táblázat). A kordicepin trimer (10^{-4} és 3×10^{-5} M-os) oldata jelentős antivirális hatással rendelkezett.

Abban az esetben, amikor a kordicepin trimer oldatot (10^{-4} , 3×10^{-5} M-os) 24 órán át tartottuk a sejteken, a vírus okozta sejtkárosodás mértékének csökkenése jóval nagyobb volt, mint az egy órás kezelésnél.

Ez a megfigyelés arra utal, hogy feltehetően a kordicepin trimer permeabilizálás nélkül is bejut a sejtekbe, hisz a hipertóniás sokk után csak rövid /10-20 perc/ ideig permeabilisabb a membrán. Ugyanakkor az is lehetséges, hogy - a hipertóniás



Kordicepin trimer koncentráció /Mól/lit/ a sejteken a vírusfertőzést követő		TCD ₅₀ /ml érték a fertőzést kö- vető 24. órában	Antivirális hatás a kont- roll %-ában
60 percig	24 óráig		
10^{-4}	0	$2,0 \times 10^2$	86
3×10^{-5}	0	$3,4 \times 10^2$	77
10^{-5}	0	$3,4 \times 10^2$	77
10^{-6}	0	$1,5 \times 10^3$	0
0	0	$1,5 \times 10^3$	-
10^{-4}	5×10^{-5}	$< 9,3 \times 10^2$	>99
3×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-5}$	$< 1,4 \times 10^2$	>91
10^{-5}	5×10^{-6}	$1,2 \times 10^3$	20
10^{-6}	5×10^{-7}	$1,4 \times 10^3$	6
0	0	$1,5 \times 10^3$	-

I. táblázat Sindbis virussal fertőzött, majd permeabilizált BHK sejtekben 1 ill. 24 óráig tartó kordicepin trimer kezelés antivirális hatása

soktól eltérő - más módszerrel, nagyobb hatásfokkal sikerül az anyagot sejtbe juttatni, s ezáltal a kordicepin trimer nagyobb hígítási oldatainál is jelentős antivirális hatást lehet elérni.

3.2.2. A különböző módon sejtbe juttatott kordicepin trimer antivirális hatásának összehasonlító vizsgálata

A kordicepin trimer antivirális hatásának előtesztjét /2.3.4./ úgy végeztük el, hogy az anyag különböző koncentrációju oldatait permeabilizálással /2.3.2./, illetve liposzóma közvetítéssel /2.3.3./ juttattuk a virusfertőzött sejtekbe. Összehasonlításként, közvetlenül a virusfertőzés után - hipertóniás sokk nélkül - mértük a kordicepin trimer oldatokat a sejtekre. Az eltérő módon sejtbe juttatott kordicepin trimer különböző koncentrációju oldatainak virusokozta sejtdegradáció csökkentő hatását (II. táblázat) értékelve megállapítható, hogy valószínűleg sem a permeabilizálás, sem a liposzóma közvetítés nem befolyásolta lényegesen a kordicepin trimer sejtbe jutásának hatásfokát, tehát a kordicepin trimer számára a virusfertőzött sejt membránja átjárható. Ezért a további kísérleteknél szükségtelennek véltük a kordicepin trimer sejtbe juttatását különböző eljárásokkal segíteni.

A kordicepin trimer

koncentráció (Mól/lit) a sejteken a fertőzést követő		antivirális hatása a kontroll %-ában		
60 percig	24 óráig	Az anyag sejtbe juttatási módja		
		permeabi- lizálás nélkül	permeabi- lizálás- sal	liposzóma közvetítés- sel
10^{-4}	5×10^{-5}	98	98	-
10^{-5}	5×10^{-6}	56	65	79
10^{-6}	5×10^{-7}	11	63	-
10^{-7}	5×10^{-8}	0	15	-
10^{-8}	5×10^{-9}	0	15	-

II. táblázat A különböző módon sejtbe juttatott kordicepin trimer Sindbis vírus okozta BHK sejtdegradáció csökkentő hatása a fertőzést követő 24. órában.

3.2.3. A különböző időben /virusfertőzés előtt, alatt,
illetve után/ alkalmazott kordicepin trimer ke-
zelés antivirális hatásának vizsgálata

Mint már megállapítottuk, a kordicepin trimer átjut a virusfertőzött sejt membránján, de ennek permeabilitását a virusfertőzés is fokozhatja /6, 8, 9/.

Annak eldöntésére, hogy a Sindbis virus okozta membrán permeabilitás növekedésének van-e szerepe a tesztelt anyag sejtbe jutásában, az előtesztelést /2.3.4./ és annak két módosított változatát is elvégeztük:

1./ A kordicepin trimer higitási sorozatát a megfelelő virus-szuszpenziókkal készítettük el, s a sejteket egy órán át egyszerre kezeltük az anyaggal és a virussal.

2./ Egy órán át a sejteken különböző koncentrációju oldato-
kat tartottunk, majd ezek eltávolítása után 1 órás virusfertő-
zés következett.

Ezek a vizsgálatok feleletet adtak arra is, hogy a kordicepin trimer antivirális hatásának mértékét befolyásolja-e az a körülmény, hogy az anyagkezelést a virusfertőzés előtt vagy után alkalmazzuk, illetve, hogy a fertőzés és kezelés egyidőben történik-e (III. táblázat).

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a kordicepin trimer anti-
virális hatását nem befolyásolja lényegesen az a körülmény,
hogy az anyagot a virusfertőzés előtt vagy után adjuk a sej-
tekhez, illetve ha a fertőzés és anyagkezelés egyidőben tör-
ténik. A sejtek kordicepin trimer kezelése után végzett virus-
fertőzés esetén is kimérhető volt az anyag antivirális hatása,

A kordicepin trimer

koncentrációja (Mól/lit)		antivirális hatása a kontroll %-ában		
a sejteken a fertőzést követő		kordicepin trimer kezelés a vírus-		
60 percig	24 óráig	előtt	fertőzés alatt	után
10^{-4}	0	77	84	88
10^{-5}	0	60	70	78
10^{-6}	0	26	43	31

III. táblázat A különböző időben /virusfertőzés előtt, alatt, után/ sejtbe juttatott kordicepin trimer Sindbis vírus okozta BHK sejt degradáció csökkentő hatása a fertőzést követő 24. órában.

tehát ezek szerint kordicepin trimer átjut a normál sejt membránján.

3.2.4. A kordicepin trimer stabilitásának vizsgálata

A rövid ideig, ill. a hosszantartó kordicepin trimeres kezelés antivirális hatásának vizsgálata során /3.2.1./ megállapítottuk, hogy ha a tesztelt anyag különböző koncentrációju oldata hosszabb ideig van jelen a fertőzött sejteken, a vírusokozta sejtdegradáció mértékének csökkenése jóval nagyobb. E megállapításból feltételezhető, hogy a kordicepin trimer vizes oldata stabil.

Kísérlettel igazoltuk feltételezésünket (IV. táblázat).

A kordicepin trimer			
koncentráció (Mól/l)		antivirális hatása a kontroll %-ában	
a sejteken a fertőzést követő		a fertőzött sejtek kezelése	
1 óráig	24 óráig	előinkubált	frissen készített
		kordicepin trimer oldattal	
10^{-4}	5×10^{-5}	>97	>91
3×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-5}$	>97	>91
10^{-5}	5×10^{-6}	33	86
10^{-6}	5×10^{-7}	0	0

IV. táblázat Az előinkubált és a frissen készített kordicepin trimer oldat Sindbis vírus okozta BHK sejt degradáció csökkentő hatása a fertőzést követő 24. órában.

Vizsgálatunk során a kordicepin trimer DMEM-ben készített steril oldatát 90 órán át, 37 °C-on termosztátban előinkubáltuk, majd a frissen készített oldatával párhuzamosan teszteltük /2.3.4./ antivirális hatását.

3.3. A sejtfagyasztás körülményeinek befolyása a kordicepin trimer antivirális hatására

Az előtesztelések során /3.2./ tapasztaltuk, hogy a vizsgált anyag antivirális hatásának mértékét az is befolyásolja, hogy milyen krioprotektív anyaggal /DMSO, glicerin/ fagyasztott sejteket használtunk fel kísérleteinkben.

Bár a felolvasztott BHK sejteket csak többszöri tripszinezés és sejtosztás után használtuk fel teszteléseinkhez, mégis azt tapasztaltuk, hogy a DMSO-ban fagyasztott sejteken a kordicepin trimer antivirális hatása jóval kisebb volt, mint a glicerinben fagyasztott sejteken a hasonló körülmények között végzett kísérleteknél.

A krioprotektív anyagok megváltoztatják a sejtmembrán permeabilitását, s bár e változás reverzibilis, valószínűnek látszik, hogy a mi esetünkben a DMSO irreverzibilis változást okozott a sejteken.

A DMSO okozta hatás a kordicepin trimer sejtbe jutását valószínűleg nem befolyásolta, hisz az anyag sejtosztódás gátló hatása ugyanugy kimérhető volt. E változás a vírus-sejt kölcsönhatást érinthette, hisz a vírus okozta sejtdegradáció - és víruskitermelés-gátlása DMSO-ban fagyasztott sejteknél alig vagy egyáltalán nem volt meghatározható. Ezért a dolgozatban leírt vizsgálatainkhoz minden esetben glicerinben fagyasztott sejteket használtunk.

3.4. A kordicepin trimer viruskitermelést befolyásoló hatásának vizsgálata

A kordicepin trimer virus okozta sejtdegradáció csökkentő hatásának előtesztelése /3.2./ során szerzett ismeretek felhasználásával megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a kordicepin trimer különböző koncentrációju oldata a fertőzött sejt virustermelését a fertőzést követő különböző időpontokban.

A tesztelt anyag virushozam befolyásoló hatásának tesztelése során /2.3.5./ begyűjtött virusminták titerét közelítő pontossággal mikrolemezen /2.2.4.1./, majd ezen adatok figyelembevételével plaque-redukciós vizsgálattal /2.2.4.2./ határoztuk meg (V. táblázat, 6. ábra).

A kapott eredményekből megállapítható, hogy a kordicepin trimer 10^{-4} Mól/l és 3×10^{-5} Mól/l koncentrációban - a fertőzést követő 18. órában - a virus titerét 89 %-kal, illetve 64 %-kal csökkentette, ami jelentős antivirális hatásnak felel meg.

A virusaliquot be-
gyűjtésének ideje
a fertőzést köve-
tően /óra/

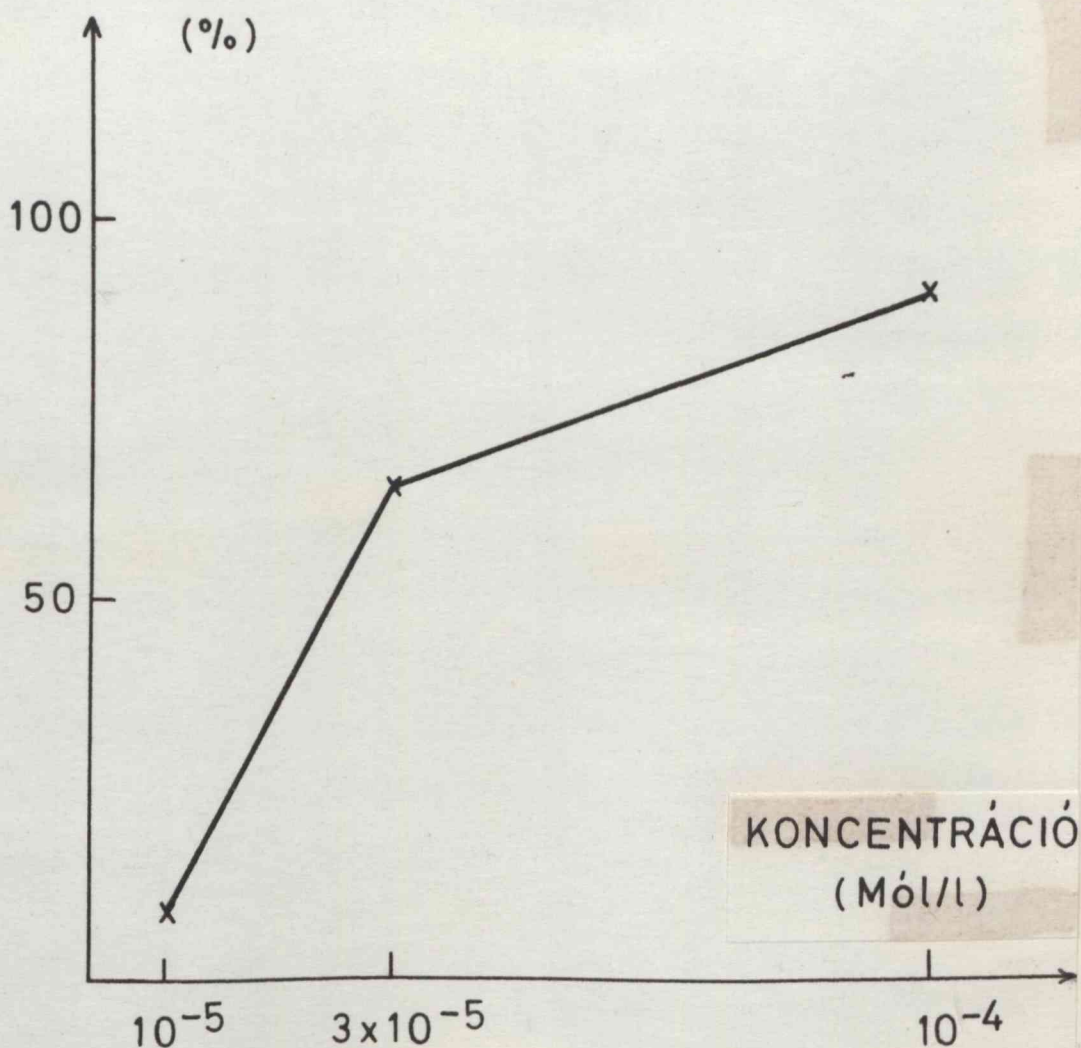
A kordicepin trimer koncentrációja (Mól/l)
a sejteken

	10^{-4}	3×10^{-5}	10^{-5}	0/kontroll
3	0	0	0	0
6	$3,0 \pm 1,3 \times 10^4$	$2,5 \pm 1,6 \times 10^4$	$2,1 \pm 1,3 \times 10^4$	$2,3 \pm 1,5 \times 10^4$
9	$1,1 \pm 0,2 \times 10^5$	$6,0 \pm 0,2 \times 10^4$	$1,6 \pm 0,4 \times 10^5$	$5,5 \pm 1,4 \times 10^4$
12	$1,2 \pm 0,2 \times 10^6$	$6,8 \pm 2,5 \times 10^5$	$7,1 \pm 2,0 \times 10^5$	$6,7 \pm 2,1 \times 10^5$
15	$3,4 \pm 1,1 \times 10^6$	$4,6 \pm 1,6 \times 10^6$	$4,5 \pm 0,4 \times 10^6$	$4,2 \pm 2,2 \times 10^6$
18	$2,7 \pm 0,8 \times 10^7$	$8,6 \pm 3,0 \times 10^7$	$2,2 \pm 1,1 \times 10^8$	$2,4 \pm 0,7 \times 10^8$

V. táblázat A kordicepin trimer különböző koncentrációju oldatainak hatása
a Sindbis virus hozamára BHK sejtekben.

/A titerértékeket 90 %-os megbízhatósági intervallummal /2.4./ közöljük./

VÍRUSSZAPORODÁS GÁTLÁS



6. ábra A kordicepin trimer hatása a Sindbis virus szaporodására BHK sejtekben.

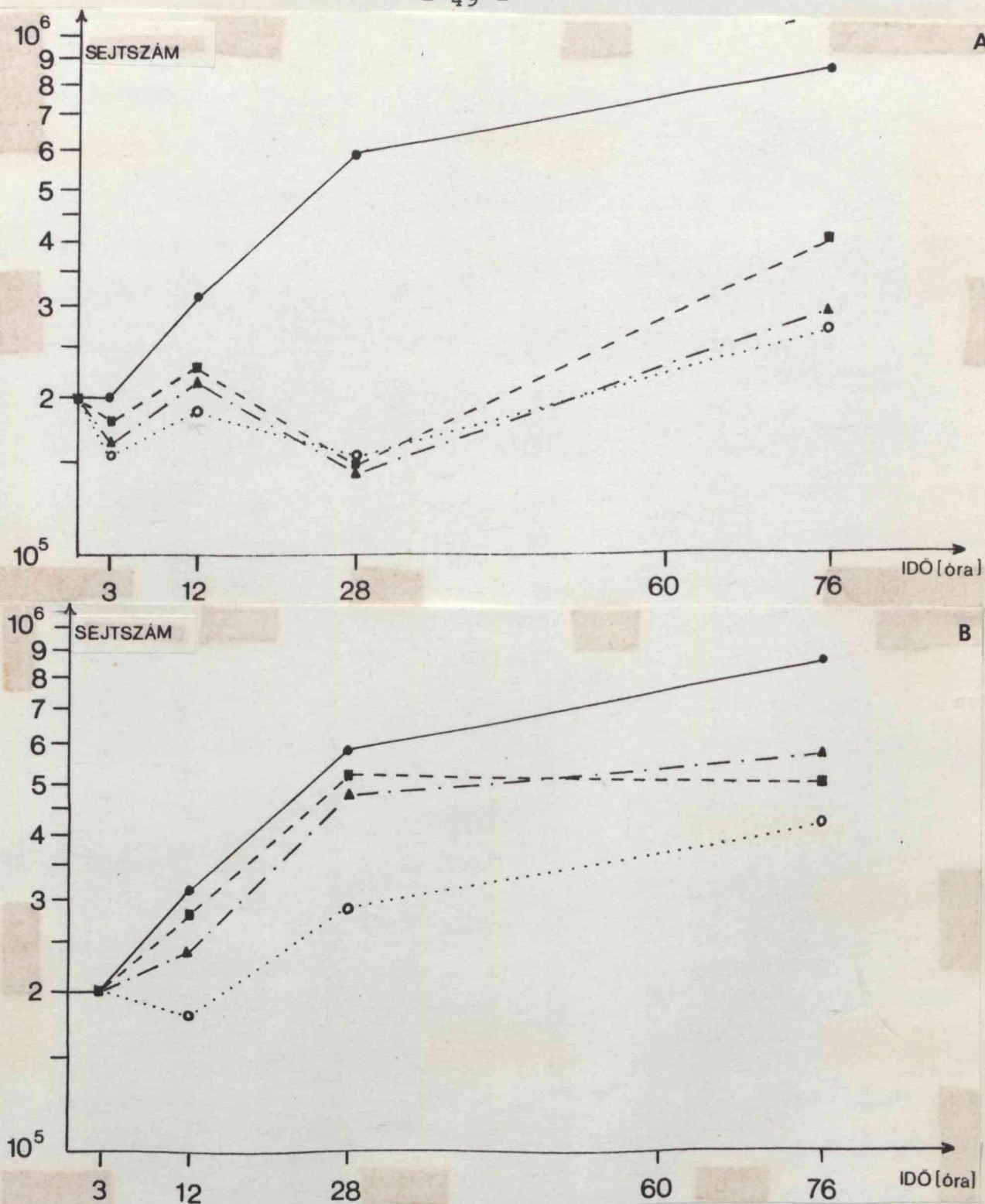
A fertőzést követő 18. órában létrejött virushozam gátlás a kontroll százalékaiban, a vizsgált anyag különböző koncentrációju oldatainak függvényében.

3.5. A kordicepin trimer hatása a sejtosztódásra

Az előtesztelések során megfigyeltük, hogy a kordicepin trimer 10^{-4} Mól/l koncentrációban, hosszantartó /48 óráig/ kezelés hatására a sejtszám - vizuálisan is érzékelhető - csökkenését okozta a kontrollhoz viszonyítva.

Kísérletet végeztünk a kordicepin trimer sejtosztódást befolyásoló hatásának vizsgálatára /2.3.6./. A tesztelt anyag hatását a sejtosztódásra különböző időpontokban végzett sejtszámlálással /2.3.6./ határoztuk meg.

Eredményeinkből megállapítható, hogy 60 perces anyagkezelés hatására a kordicepin trimer koncentrációjától függően a BHK sejt osztódásának mértéke csökkent (7A. ábra). Abban az esetben, amikor a kordicepin trimer oldat a sejtszám meghatározásáig, folyamatosan jelen volt a sejteken a sejtosztódás gátlás még nagyobb mértékű (7B. ábra).



7. ábra A kordicepin trimer különböző koncentrációju oldatának hatása a BHK sejt osztódására.

- A. A kezelést 60 percen át végeztük a kordicepin trimer 10^{-4} Mól/l, 3×10^{-5} Mól/l, 10^{-5} Mól/l koncentrációju oldatával, ill. \bullet — \bullet DMEM-mel /kontroll/.
- B. A kordicepin trimer koncentrációja a sejteken a sejtszám meghatározásáig, folyamatosan 10^{-5} Mól/l, 3×10^{-6} Mól/l, 10^{-6} Mól/l ill. \bullet — \bullet DMEM /kontroll/ volt.
- /A kezelés első órájában az anyag koncentrációja tízszer magasabb 10^{-4} Mól/l, 3×10^{-5} Mól/l ill. 10^{-5} Mól/l volt./



4. DISZKUSSZIÓ

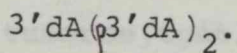
Az antivirális anyagkutatás területén csoportunk 1978-ban kezdte meg munkáját.

Az első, általunk szintetizált anyagok - a kémiai munkákban jómagam is résztvettem - a (2'-5')ApApA és a (2'-5')ApA voltak, melyek biológiai tesztjét a SZOTE Mikrobiológiai Tanszékén végezték. Ezek a vizsgálatok még a nemzetközi szakirodalomból /60/ ismert kísérletek eredményeinek alapján folytak.

A későbbiekben, a virológiai tesztelő laboratóriumunk létrehozásával párhuzamosan - a célkitűzéseink című fejezetben vázoltaknak megfelelően - olyan 2'-5' internukleotid kötést tartalmazó oligonukleotidokat szintetizáltunk, melyekben a nukleozid nem adenozin /pl. inozin/ volt.

A már általam végzett biológiai tesztelések azt mutatták - mint az később a szakirodalomból ismertté vált /17, 54/ -, hogy a természetes oligonukleotidtól bázisukban eltérő vegyületek nem antivirálisak.

A nemzetközi kutatás eredményeként részleteiben megismertük az interferon hatásmechanizmusának enzim rendszereit. Mikor ismertté vált, hogy a $\text{pppA}(2'\text{pA})_n$ -t degradáló 2'foszfodiészteráz enzim működéséhez szabad 3' láncvég és az internukleotid kötések szabad 3'-(2'-)OH csoportjának megléte szükséges /50/, olyan analóg szintézisét határoztuk el, melynek nincsenek 3'OH csoportjai. Ilyen oligonukleotid analóg a kordicepin trimer, a (2'-5')



Az általam végzett biológiai vizsgálatokból megállapítottuk, hogy a kordicepin trimer a Sindbis vírus okozta BHK

sejtkárosodás mértékét a fertőzés előtt és után alkalmazott anyagkezelés egyaránt jelentősen csökkentette. A vírus hozamát 10^{-4} Mól/l koncentrációnál 89 %-kal, 3×10^{-5} Mól/l-nél 64 %-kal gátolta. A tesztelt anyag a sejt osztódásának mértékét is csökkentette.

A kordicepin trimer általunk tapasztalt sejtosztódás gátló hatása alapján az Országos Onkológiai Kutató Intézetben elkezdtek a daganatos sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Eddigi eredményeik alapján megállapították, hogy különböző típusu humán lymphoma sejtek osztódását 2×10^{-5} Mól/l koncentrációban - tipustól függően - 30-50 %-kal csökkentette. Ilyen kedvező hatást korábban csak magas koncentrációju interferon kezeléssel lehetett elérni.

A kordicepin trimer ezen hatásai /antiviralitás, sejtosztódás gátlás/ az anyag koncentrációjának és a kezelés időtartamának növelésével fokozódtak.

Megállapítottuk továbbá, hogy az anyag vizes oldata nem bomlékony és normál körülmények között is bejut a sejtbe. A $\text{pppA}(2'\text{pA})_n$ biológiai rendszerekben kevésbé stabil /16/ és csak a permeabilizált membránon át képes a sejtbe jutni /60/. A kordicepin trimer ezen előnyösebb tulajdonságai egy lehetséges kemoterápiás felhasználás esetén nagy jelentőségűek.

"Az interferon kémiája és biológiája: kapcsolata a terápiához" címmel Kaliforniában 1982 tavaszán /25/ megtartott konferencián megállapítást nyert, hogy az interferon antivirális, tumorsejtgátló és immunrendszer aktiváló hatása korellációban van, s ezért a $\text{pppA}(2'\text{pA})_n$ a felelős.

Kísérleti körülményeink között e három hatásból kettőt sikerült bizonyítanunk, melyek alapján megállapíthatjuk, hogy

a kordicepin trimer a természetes $\text{pppA}(2'\text{pA})_n$ egy olyan analógja, mely szerkezetében hasonló, biológiai hatásában meg-
egyező, sőt bizonyos szempontokból előnyösebb tulajdonságu
vegyület.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE

A kordicepin trimer BHK sejten történt tesztelése során megállapítottuk, hogy a Sindbis vírus hozamát, valamint a sejtdegradáció mértékét - a fertőzés előtt és után alkalmazott anyagkezelés - jelentősen csökkenti. A vizsgált anyag gátolja a BHK és tumoros sejtek osztódását is.

Ezek a tulajdonságok azt mutatják, hogy a kordicepin trimer hatása hasonló az interferon kezelés során keletkező természetes analóg $[pppA(2'PA)_n]$ biológiai hatásához, azaz antivirális és a sejtosztódás mértékét csökkenti.

A kordicepin trimer előnye a $pppA(2'PA)_n$ -nel szemben az, hogy természetes körülmények között is átjut a membránon és stabilabb.

A vizsgálataink alapján végzett további kutatások eldönthetik a kordicepin trimer vírusfertőzést megelőző /profilaktikum/, ill. gyógyító /kemoterápiikum/, valamint antineoplastikus anyagként való alkalmazhatóságának lehetőségét.

1. Benedetto, A., Rossi, G.B., Ajello, C., Polardelli, F., Cioè, L., Carruba, G., and Carrasco, L. (1980): Inhibition of animal virus production by means of translation inhibitors unable to penetrate normal cells. *Virology*, 106, 123-132.
2. Buchanan, R.A. (1979): Advances in antiviral chemotherapy. *Can. Med. Assoc. J.*, 120, 7-9.
3. Carrasco, L. (1978): Membran leakiness after viral infection and a new approach to the development of antiviral agents. *Nature*, 272, 694-699.
4. Carrasco, L. (1981): Modification of membrane permeability induced by animal viruses entry to cytoplasm. *Virology*, 113, 523.

6. IRODALOM, J.J., Miller, M.R., and Barbois, A.B. /1978/:
Animal cells reversibly permeable to small molecules.
1. Baglioni, C. /1979/: Interferon-induced enzymatic activities and their role in the antiviral state. *Cell*, 17, 255-264.
 2. Baglioni, C., D'Alessandro, S.B., Nilsen, T.W., den Hartog J.A.J., Crea, R., and van Boom, J.H. /1981/: Analogs of /2'-5'/oligo/A/. *J. Biol. Chem.*, 256, 3253-3257.
 3. Baglioni, C., and Maroney, P.A. /1980/: Human leukocyte interferon induces 2'-5'-oligo/A/ polymerase and protein kinase. *Virology*, 101, 540-544.
 4. Baglioni, C., Maroney, P.A., and West, D.K. /1979/: 2'5'Oligo/A/ polymerase activity and inhibition of viral RNA synthesis in interferon-treated HeLa cells. *Biochemistry*, 18, 1765-1770.
 5. Baglioni, C., Minks, M.A., and Maroney, P.A. /1978/: Interferon action maybe mediated by activation of a nuclease by pppA2'p5'A2'p5'A. *Nature*, 273, 684-687.
 6. Benedetto, A., Rossi, G.B., Amici, C., Belardelli, F., Cioé, L., Carruba, G., and Carrasco, L. /1980/: Inhibition of animal virus production by means of translation inhibitors unable to penetrate normal cells. *Virology*, 106, 123-132.
 7. Buchanan, R.A. /1979/: Advances in antiviral chemotherapy. *Can. Med. Assoc. J.*, 120, 7-9.
 8. Carrasco, L. /1978/: Membran leakiness after viral infection and a new approach to the development of antiviral agents. *Nature*, 272, 694-699.
 9. Carrasco, L. /1981/: Modification of membrane permeability induced by animal viruses early in infection. *Virology*, 113, 623.

10. Castellot, J.J., Miller, M.R., and Pardee, A.B. /1978/:
Animal cells reversibly permeable to small molecules.
Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 351-355.
- 10 b. Charubala, R., and Pflleiderer, W. /1980/: Tetrahedron
Lett. 21, 4077-4080.
11. Chernajovsky, Y., Kimchi, A., Schmidt, A., Zilberstein, A.,
and Revel, M. /1979/: Differential effects of two interferon-
-induced translational inhibitors on initiation of protein
synthesis. Eur. J. Biochem., 96, 35-41.
12. Clemens, M.J., and Williams, B.R.G. /1978/: Inhibition of
cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel
oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell
extracts. Cell, 13, 565-572.
13. Cohen, S.S. /1979/: Comparative biochemistry and drug
design for infections disease. Science, 205, 964-971.
14. Desrosiers, R.C., and Lengyel, P. /1977/: Impairment of
reovirus mRNA cap methylation in interferon-treated L cells.
Fed. Proc., 36, 812.
15. Doetsch, P.W., Suhadolnik, R.J., Sawada, Y., Mosca, J.D.,
Flick, M.B., Reichenbach, N.L., Dang, A.Q., Wu, J.M.,
Charubala, R., Pflleiderer, W., and Henderson, E.E. /1981/:
Core/2'-5'/oligoadenilate and the cordycepin analog:
inhibitors of Epstein-Barr virus-induced transformation
of human lymphocytes in the absence of interferon. Proc.
Natl. Acad. Sci., 78, 6699-6703.
16. Doetsch, P.W., Wu, J.M., Sawada, Y., and Suhadolnik, R.J.
/1981/: Synthesis and characterization of /2'-5'/ppp3'dA
/p3'dA/_n, an analogue of /2'-5'/pppA/pA/_n. Nature, 291,
355-358.

17. Drocourt, J.L., Dieffenbach, C.W., Ts'o, P.O.P., Justensen, J., and Thang, M.N. /1982/: Structural requirements of /2'-5'/ oligoadenilate for protein synthesis inhibition in human fibroblasts. Nucl. Acids Res., 10, 2163-2174.
18. Edge, M.D., Greene, A.R., Heathcliffe, G.R., Meacock, P.A., Schuch, W., Scanlon, D.B., Atkinson, T.C., Newton, C.R., and Markham, A.F. /1981/: Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. Nature, 292, 756-762.
19. Epstein, L.B. /1982/: Interferon-gamma: success, structure and speculation. Nature, 295, 453-454.
20. Farrell, P.J., Balkow, K., Hunt, T., Jackson, R.J., and Trachsel, H. /1977/: Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. Cell, 11, 187-200.
21. Farrell, P.J., Sen, G.C., Dubois, M.F., Ratner, L., Slattery, E., and Lengyel, P. /1978/: Interferon action: two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5893-5897.
22. Ferra, F., and Baglioni, C. /1981/: Viral messenger RNA unmethylated in the 5'-terminal guanosine in interferon-treated HeLa cells infected with Vesicular stomatitis virus. Virology, 112, 426-435.
23. Floyd-Smith, G., Slattery, E., and Lengyel, P. /1981/: Interferon action: RNA cleavage pattern of a /2'-5'/ oligo-adenilate-dependent endonuclease. Science, 212, 1030-1032.
24. Friedman, R.M. /1977/: Antiviral activity of interferons. Bact. Rev., 41, 543-567.
25. Friedman, R.M., Epstein, L.B., and Merigan, T.C. /1982/: Interferon redux. Nature, 296, 704-705.

26. Galasso, G.J. /1981/: An assessment of antiviral drugs for the management of infectious diseases in humans. *Antiviral Res.*, 1, 73-96.
27. Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J., Wallace, D.M., Berger, S.L., Levinson, A.D., and Goeddel, D.V. /1982/: Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature*, 295, 503-508.
28. Grunert, R.R. /1979/: Search for antiviral agents. *Ann.Rev. Microbiol.*, 33, 335-353.
29. Herrmann, E.C., and Herrmann, J.A. /1979/: Diagnosis of viral disease and advent of antiviral drugs. *Pharmac. Ther.*, 7, 35-69.
30. Hirsch, M.S., and Swartz, M.N. /1980/: Antiviral agents. *New England J.Med.*, 302, 903-907, 949-953.
31. Ho, M. /1962/: Kinetic considerations of the inhibitory action of an interferon produced in chick cultures infected with Sindbis virus. *Virology*, 17, 262-275.
32. Horváth, I. /1974/: Kvantitatív mikrobiológiai eljárások. Akadémiai Kiadó, 25-33.
33. Hovanessian, A.G., Brown, R.E., and Kerr, I.M. /1977/: Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme from interferon-treated cells. *Nature*, 268, 537-540.
34. Hovanessian, A., and Wood, J.N. /1980/: Anticellular and antiviral effect of pppA/2'p5'A/_n. *Virology*, 101, 81-90.
35. Kerr, I.M., and Brown, R.E. /1978/: pppA2'p5'A2'p5'A: An inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 256-260.



36. Kerr, I.M., Brown, R.E., and Hovanessian, A.G. /1977/:
Nature of inhibition of cell-free protein synthesis formed
in response to interferon and double-stranded RNA.
Nature, 268, 540-542.
37. Kimchi, A., Shure, H., and Revel, M. /1981/: Anti-mitogenic
function of interferon-induced /2'-5'/oligo(adenylate/ and
growth-related variations in enzymes that synthesize and
degrade this oligonucleotide. Eur. J. Biochem., 114, 5-10.
38. Kimchi, A., Shure, H., and Revel, M. /1979/: Regulation of
lymphocyte mitogenesis by /2'-5'/oligo-isoadenilate.
Nature, 282, 849-851.
39. Kondorosi, É., and Duda, E. /1980/: Introduction of foreign
genetic material into cultured mammalian cells by liposomes
loaded with isolated nuclei. FEBS Lett., 120, 37-40.
40. Kruse, P.F., and Patterson, M.K. /1973/: Tissue culture
/Methods and applications/. Acad. Press New York and London,
527-532.
41. Martin, E.M., Birdsall, N.J.M., Brown, R.E., and Kerr, I.M.
/1979/: Enzymic synthesis, characterization and nuclear-
-magnetic resonance spectra of pppA2'p5'A2'p5'A and related
oligonucleotides: comparison with chemically synthesized
material. Eur. J. Biochem., 95, 295-307.
42. Marx, J.L. /1979/: Interferon /I/: On the threshold of
clinical application. Science, 204, -183-1186.
43. Marx, J.L. /1979/: Interferon /II/: Learning about how it
works. Science, 204, 1293-1295.
44. Maugh, T.H. /1979/: Panel urges wide use of antiviral drug.
Science, 206, 1058-1060.
45. Metz, D.H. /1975/: The mechanism of action of interferon.
Cell, 6, 429-439.

46. Minks, M.A., Benveniste, S., Maroney, P.A., and Baglioni, C. /1979/: Metabolic stability of 2'5' oligo(A) and activity of 2'5' oligo(A)-dependent endonuclease in extracts of interferon-treated and control cells. Nucl. Acids Res., 6, 767-780.
47. Morser, J. and Burke, D.C. /1979/: Interferon and double-stranded RNA. Nature, 277, 435.
48. Nagata, S., Taira, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M., Ecsödi, J., Boll, W., Cantell, K., and Weissman, C. /1980/: Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. Nature, 284, 316-320.
49. Samanta, H., Dougherty, J.P., and Lengyel, P. /1980/: Synthesis of (2'-5') /A/ _n from ATP. J. Biol. Chem., 255, 9807-9813.
50. Schmidt, A., Chernajovsky, Y., Schulman, L., Federman, P., Berissi, H., and Revel, M. /1979/: An interferon-induced phosphodiesterase degrading (2'-5') oligoisoadenilate and the CCA terminus of tRNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 4788-4792.
51. Schmidt, A., Zilberstein, A., Shulman, L., Federman, P., Berissi, H., and Revel, M. /1978/: Interferon action: isolation of nuclease F, a translation inhibitor activated by interferon-induced (2'-5')/oligo-isoadenilate. FEBS Lett., 95, 257-264.
52. Sen, G.C. /1982/: Mechanism of interferon action: progress toward its understanding. Prog. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol., 27, 105-156.

53. Silverman, R.H., Cayley, P.J., Knight, M., Gilbert, C.S., and Kerr, I.M. /1982/: Control of the ppp/A2'p/_nA system in HeLa cells, effects of interferon and virus infection. Eur. J. Biochem., 124, 131-138..
54. Silverman, R.H., Wreschner, D.H., Gilbert, C.S., and Kerr, I.M. /1981/: Synthesis, characterization and properties of ppp/A2'p/_nApCp and related high-specific-activity ³²P-labelled derivatives of ppp/A2'p/_nA. Eur. J. Biochem., 115, 79-85.
55. Smee, D.F., Sidwell, R.W., Clark, S.M., Barnett, B.B., and Spendlove, R.S. /1981/: Inhibition of Reoviruses in vitro by selected antiviral substances. Antiviral Res., 1, 315-323.
56. Smith, R.A., Sidwell, R.W., and Robins, R.K. /1980/: Antiviral mechanisms of action. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 20, 259-284.
57. Stark, G.R., Dower, W.J., Schimke, R.T., Brown, R.E., and Kerr, I.M. /1979/: 2-5 Synthetase: assay, distribution and variation with growth or hormone status. Nature, 278, 471-473.
58. Torrence, P.F., Imai, J., and Johnson, M.I. /1981/:
5'-O-Monophosphoryladenyllyl/2'-5'/adenyllyl/2'-5'/adenosine
is an antagonist of the action of 5'-O-triphosphoryladenyllyl
/2'-5'/adenyllyl/2'-5'/adenosine and double-stranded RNA.
Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 5993-5997.
59. Williams, B.R.G., Golgher, R.R., and Kerr, I.M. /1979/:
Activation of a nuclease by pppA2'p5'A2'p5'A in intact cells.
FEBS Lett., 105, 47-52.
60. Williams, B.R.G., and Kerr, I.M. /1978/: Inhibition of
protein synthesis by 2'-5'linked adenine oligonucleotides in
intact cells. Nature, 276, 88-90.
61. Williams, B.R.G., Kerr, I.M., Gilbert, C.S., White, C.N.,
and Ball, L.A. /1978/: Synthesis and breakdown of

pppA2'p5'A2'p5'A and transient inhibition of protein synthesis in extracts from interferon-treated and control cells.

Eur. J. Biochem., 92, 455-462.

62. Zilberstein, A., Kimchi, A., Schmidt, A., and Revel, M. /1978/: Isolation of two interferon-induced translational inhibitors: a protein kinase and an oligo-isoadenylate synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 4734-4738.
63. Yamamoto, K., Yamaguchi, N., and Oda, K. /1975/: Mechanism of interferon-induced inhibition of early Simian virus 40 /SV 40/ functions. Virology, 68, 58-70.

